

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



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo preclínico de la inmunoterapia adoptiva con  
células NK-CAR alogénicas para el tratamiento de mieloma  
múltiple refractario y en recaída**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Elena Maroto Martín**

**Directores**

**Antonio Valeri Lozano**  
**Joaquín Martínez López**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

Desarrollo preclínico de la inmunoterapia adoptiva con células NK-CAR alogénicas para el tratamiento de mieloma múltiple refractario y en recaída

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Maroto Martín

DIRECTORES

Antonio Valeri Lozano

Joaquín Martínez López

**Madrid, 2023**







*“Have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary”*

*Steve Jobs*



*A mis padres, Juan y Conchi.*

*A mi marido, Javi.*

*A la memoria de mis tías, Rosi y Anabel.*





## *AGRADECIMIENTOS*

No puedo empezar sin dar las gracias al maravilloso equipo, a todas y a cada una de las personas que a lo largo de los años me han ayudado, tanto en la elaboración de este trabajo como personalmente. Esta tesis no sería posible sin todos vosotros.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis por aceptarme en su equipo y permitirme formarme como investigadora. El Dr. Joaquín Martínez, de él me llevo su ambición y sus ganas de ayudar siempre. Al Dr. Antonio Valeri, gracias por acogerme en el despacho, por guiarme y por enseñarme tanto de ciencia como de la vida misma.

A la Dra. Paula Río, gracias por tu infinita paciencia, tu gran disposición y todo tu apoyo en estos años.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, por compartir conmigo esta montaña rusa de emociones. Especialmente a mi Paqui, la revolución personificada, gracias por sacarme siempre una sonrisa, hasta en los peores momentos, y por aportar ese granito de locura que es tan necesario. A las Lauras, Laura C y Laura S, por alegrarme los días y no rechazar un buen cotilleo. Gracias por vuestros consejos por los pasillos, qué bien sienta desahogarnos juntas. A Alba, Roberto, MLuz, Noemí, Natalia, Raquel e Irene, gracias por los ratitos de desconexión en las comidas y compartir risas juntos, gracias por animarme y escucharme siempre que lo he necesitado. Gracias también a Richard por sus *doodle* para juntar a los *predoques* y pasar buenos ratos, y a mis compañeros del CNIO Pedro, Michel y compañía, por vuestras risas y vuestro buen rollazo, que recargan siempre de energía. ¡Viva el *Hemato Beer Team*!

Gracias en especial a “las chicas”. ¡Qué habría hecho sin vosotras! Jessica, Eva, Raquel y Almu, gracias por ayudarme y enseñarme tanto. Por nuestras frases célebres del despacho, las risas en los mejores momentos y la compañía en los momentos menos buenos. No olvidemos a Jessi y su bendito “iluminador” que nos salvó la vida, te elegiría mil veces como compañera, siempre con una sonrisa y dispuesta a ayudar, gracias por tu inmensa generosidad; a Almu, la mami del grupo, por superar juntas nuestros miedos entre risas (nuestro primer debut con animales es para recordar) y por cuidarnos siempre. A Eva, gracias por escuchar mis dramas y compartir el día a día conmigo, sin ti los largos paseos al centro de investigaciones y las tardes de cabina “entre cordón y cordón” no hubieran sido ni la mitad de buenos. A Raquel, por ayudarme tanto en esta recta final y por nuestras recomendaciones culinarias, gracias por esa energía tan bonita

que transmites siempre. Pero, sobre todo, gracias chicas por escucharme y estar a mi lado. Habéis sido un apoyo enorme estos años.

A mi amor incondicional, Javi, gracias por quererme tanto. Te estaré eternamente agradecida, por tu apoyo cada día, tu optimismo y por cuidarme siempre. Gracias por aguantar mis momentos de agobio y mis frustraciones porque, pese a todo, siempre estás a mi lado. Por ayudarme a crecer día a día, sacarme de mi zona de *comfort* y enseñarme a soñar a lo grande. Gracias también a su familia, que se ha convertido en mi familia y un gran apoyo. A los más pequeños de la casa, Gonzalo y Cayetana, mi luz y mi alegría, mis dos tesoros.

A mi familia, sin ellos nada sería posible. Papá, mamá, gracias por animarme a avanzar y por ayudarme a conseguir todo lo que me propongo. Gracias a mis hermanos, Jorge y Laura, con quien he compartido todo y he aprendido tanto. A mi abuela, por intentar entender lo que hago y creer siempre en mí. A mis tías Rosi y Anabel, a quienes me gustaría dedicarles este trabajo. Sin duda, ellas son los mayores artífices de mi vocación y me han dado fuerzas para seguir investigando. Algún día curaremos el cáncer. Simplemente gracias, familia, sois y seréis el pilar más importante en mi vida.

Gracias también a mis amigos de la universidad, verlos hace que se pare el tiempo, gracias a la Noe's por todos los momentos compartidos en estos últimos años, las celebraciones juntos, los memorables bingos y alguna que otra noche surrealista. En especial a Álvaro, Vero y Vir, gracias por estar siempre a mi lado, aguantando mis "chapas", desahogándonos juntos con cerveza en mano y compartiendo momentos especiales, y qué bonito es avanzar a vuestro lado. Gracias al resto de amigos, a los de siempre y a los que la vida ha puesto en mi camino a lo largo de estos años, que me habéis apoyado en este largo proceso, me habéis escuchado (aun sin entender ni jota muchas veces), y me habéis aportado vuestra chispa de felicidad en un momento tan necesario. Gracias por estar en mi vida.

Por último, gracias a todos los donantes y pacientes que han contribuido en esta investigación, y a la fundación CRIS contra el Cáncer, el Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, el CNIO y el CIEMAT, que han hecho posible este trabajo.

¡GRACIAS!





# ÍNDICE



<b>1. RESUMEN/ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1. Mieloma múltiple.....	13
1.1. Definición y aspectos generales .....	13
1.2. Epidemiología y etiología .....	14
1.3. Estadificación de los pacientes y pronóstico: evaluación del riesgo en MM15	
1.4. Fisiopatogenia .....	16
1.5. Evolución clínica.....	20
1.6. Diagnóstico .....	23
1.7. Tratamiento de primera línea .....	25
1.8. Tratamiento del mieloma múltiple refractario y en recaída (MM/RR).....	30
1.9. Inmunosupresión asociada a MM/RR.....	32
2. Inmunoterapia en mieloma múltiple .....	34
2.1. Inmunoterapia pasiva .....	36
2.1.1. Anticuerpos monoclonales .....	36
2.1.2. Anticuerpos biespecíficos de células T (BiTE) .....	37
2.1.3. Inmunoterapia adoptiva CAR.....	38
2.1.4. Dianas clave en la inmunoterapia del MM.....	39
2.1.5. Inmunoterapia T-CAR en MM.....	43
3. Inmunoterapia NK-CAR en MM.....	46
3.1. Propiedades nativas de la célula NK por las que superan a la inmunoterapia con células T .....	48
3.2. Fuentes de obtención de células NK para inmunoterapia NK-CAR.....	52
3.3. Estudios preclínicos y ensayos clínicos en MM con células NK-CAR procedentes de SP y de cordón umbilical .....	56
3.4. Terapias en combinación con inmunoterapia NK CAR en MM.....	59
3.5. Mecanismos de acción antitumorales descritos de los inhibidores de gamma-secretasas (GSI) en monoterapia, en combinación con inmunoterapia CAR o con bortezomib.....	61
3.6. Respuesta al daño en el ADN (DDR) y estrés genotóxico inducido por bortezomib (BTZ) .....	62
3.7. Senescencia inducida por terapia (TIS) y efectos pro-tumorales inducidos por la reversión del fenotipo senescente.....	64
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
HIPÓTESIS .....	73
OBJETIVOS .....	74
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
1. Cultivos celulares y muestras primarias .....	77
1.1. Líneas celulares.....	77
1.2. Muestras de pacientes y donantes sanos .....	78
2. Aislamiento, cultivo, expansión y transducción de células NK y purificación de células primarias de MM .....	79
2.1. Obtención y cultivo de células NK a partir de sangre de cordón umbilical (CB-NK) .....	79
2.2. Aislamiento y purificación de células plasmáticas de pacientes de MM.....	80
2.3. Diseño de las moléculas CAR.....	80
2.4. Producción de sobrenadantes lentivirales de 3ª generación .....	81
2.5. Producción de sobrenadantes gamma-retrovirales.....	82



2.6. Titulación de sobrenadantes lentivirales .....	83
2.7. Transducción lentiviral.....	83
2.8. Transducción gamma-retroviral .....	84
3. Análisis por q-PCR del número de copias del vector (VCN) por célula .....	84
4. Supresión de la expresión de BCMA mediante edición genómica.....	85
5. Citometría de flujo (CMF) .....	86
5.1. Caracterización de las poblaciones: inmunofenotipo.....	88
5.2. Cuantificación de citoquinas solubles y proteínas citotóxicas liberadas al sobrenadante.....	88
5.3. Análisis del ciclo celular .....	88
5.4. Estudio de apoptosis celular mediante marcaje con anexina-V .....	89
5.5. Análisis de proliferación celular mediante marcaje con Ki67 .....	89
5.6. Estudio del efecto de la inhibición de Chk2 sobre la expresión de NKG2D-L .....	89
6. Ensayos de funcionalidad in vitro.....	90
6.1. Ensayo de citotoxicidad frente a células diana de MM.....	90
6.2. Ensayo de toxicidad frente a células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) de donante sano.....	91
7. Generación de líneas celulares de MM resistentes a Bortezomib (BTZ) .....	91
7.1. Estudio de las mutaciones de la línea resistente ARP1 KO R16 .....	91
8. Western-blot (WB).....	92
8.1. Detección de las moléculas CAR.....	93
8.2. Análisis de la actividad del proteasoma .....	94
8.3. Estudio de senescencia y daño en el ADN.....	94
9. Ensayo fluorimétrico para medir la actividad $\beta$ -galactosidasa .....	94
10. Experimentos en ratón .....	95
10.1. Análisis de biodistribución tumoral mediante imagen in vivo.....	96
10.2. Análisis de la compatibilidad KIR-HLA.....	96
10.3. Análisis de lesiones líticas por rayos X.....	96
10.4. Análisis de persistencia de los efectores inmunes.....	97
10.5. Análisis de injerto de las distintas poblaciones en sangre periférica, médula ósea y bazo .....	97
10.6. Análisis histoquímico.....	97
10.7. Análisis del plasma de los ratones .....	98
11. Análisis estadístico .....	98
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
1. Generación y caracterización de las células NK-92MI transducidas con los CAR de segunda generación NKG2D y BCMA como terapia frente a MM.....	101
1.1. Construcción de lentivectores CAR.....	101
1.2. Generación y caracterización de las células NK-92MI CAR.....	101
1.3. La expresión de los CAR NKG2D y BCMA en las células NK-92MI mejora la eficacia antitumoral in vitro de la población parental frente a líneas celulares de MM .....	105
1.4. La potencia citotóxica de las células NK-92MI BCMA CAR es superior a la de la población NK-92MI NKG2D CAR sobre células plasmáticas primarias de MM .....	107
2. La coexpresión de los CAR NKG2D y BCMA en las células NK-92MI incrementa la cobertura citotóxica sobre líneas celulares de MM pero no exhibe una sinergia en cuanto a la actividad antitumoral .....	110
3. La irradiación a dosis clínicas de las células NK-92MI CAR anula por completo	

su eficacia antitumoral in vivo.....	113
3.1. Dosis de irradiación inferiores a la dosis clínica aumentan ligeramente la persistencia in vitro de las células NK-92MI CAR.....	114
3.2. Las dosis de irradiación en las células NK-92MI NKG2D CAR inferiores a la aprobada para uso clínico no aseguran el control de la proliferación in vivo...	117
4. La modificación génica de las células NK-92MI CAR para que expresen un interruptor suicida regula la supervivencia de los efectores in vitro, pero no es suficiente para controlar su proliferación in vivo .....	120
5. Generación de células NK CAR activadas y expandidas procedentes de sangre de cordón umbilical .....	124
5.1. Los efectores alogénicos NK-92MI CAR y CB-NK CAR presentan similar potencia citotóxica in vitro frente a MM.....	128
5.2. Comparación de la eficacia in vivo de los distintos efectores alogénicos: NK-92 CAR vs CB-NK CAR .....	130
6. El pretratamiento con BTZ+GSI de células de MM resistentes a BTZ potencia la actividad antitumoral del CAR NKG2D.....	136
6.1. El tratamiento BTZ+GSI en células de MM resistentes a BTZ se asocia con la acumulación y la respuesta al daño en el ADN.....	140
6.3. El pretratamiento con la combinación BTZ+GSI de las células de MM resistentes aumenta la eficacia in vivo de las células CB-NK NKG2D CAR...	148
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>151</b>
1. Las células NK-92 redirigidas con los CAR de BCMA y NKG2D muestran una potencia lítica similar frente a líneas celulares de MM y su eficacia se asocia a los niveles de expresión de sus dianas CAR. ....	153
2. La irradiación de las células NK-92MI anula su eficacia in vivo.....	156
3. Las células CB-NK BCMA CAR son más eficaces eliminando células primarias de MM in vitro e inducen respuestas más duraderas in vivo que las células NK NKG2D CAR .....	160
4. La combinación del tratamiento BTZ+GSI induce senescencia prematura en las células de MM resistentes e incrementa su antigenicidad, lo que facilita su eliminación por las células NK NKG2D CAR.....	163
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>173</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>177</b>
<b>9. ABREVIATURAS .....</b>	<b>203</b>



## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Las células plasmáticas de MM secretan inmunoglobulinas monoclonales. .	14
Figura 2. Maduración de las células B y evolución clonal. ....	18
Figura 3. Fisiopatogenia del mieloma múltiple. ....	20
Figura 4. Evolución clínica del MM. ....	21
Figura 5. Esquemas de tratamiento más utilizados para los pacientes de MM. ....	26
Figura 6. Mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma. ....	29
Figura 7. Inmunosupresión en el mieloma múltiple. ....	34
Figura 8. La inmunoterapia en MM. ....	35
Figura 9. Estructura y clasificación de una molécula CAR. ....	38
Figura 10. Propiedades relevantes derivadas del uso de las células NK-CAR. ....	48
Figura 11. Representación esquemática del desarrollo y diferenciación de las células NK. ....	49
Figura 12. Representación esquemática de las funciones de la célula NK. ....	50
Figura 13. Expresión de los receptores activadores e inhibidores más importantes de una célula NK. ....	52
Figura 14. Rutas de señalización de daño por roturas simples y dobles en el ADN. ....	63
Figura 15. Funciones asociadas al fenotipo senescente SASP. ....	69
Figura 16. Protocolo de obtención y expansión de células CB-NK CAR. ....	79
Figura 17. Esquema del protocolo de obtención de CP puras a partir de médula ósea de pacientes de MM. ....	80
Figura 18. Análisis representativo de la curva de amplificación de la secuencia psi en muestras de líneas celulares NK-92 y células NK primarias. ....	85
Figura 19. Supresión de la expresión de BCMA mediante edición génica utilizando el sistema BCMA CRISPR/Cas9 <i>Knockout</i> . ....	86
Figura 20. Generación y caracterización de la actividad lítica de las células NK-92MI CAR. ....	105
Figura 21. Las células NK-92MI CAR superan la eficacia antitumoral de las células NK-92MI parentales. ....	109
Figura 22. Las células NK-92MI que coexpresan los CAR NKG2D y BCMA no exhiben mayor potencia antitumoral que las células con expresión simple de los CAR, aunque muestran una mayor cobertura citotóxica. ....	112
Figura 23. La irradiación a dosis clínicas de las células NK-92MI CAR anula su eficacia in vivo. ....	117
Figura 24. Dosis de irradiación de NK-92MI CAR inferiores a la dosis clínica no consiguen controlar la proliferación de los efectores CAR in vivo. ....	120
Figura 25. La expresión del interruptor suicida iCasp9- $\Delta$ CD19 en las células NK-92MI CAR permite conservar la potencia citotóxica in vitro, pero no consigue controlar la proliferación celular in vivo. ....	124
Figura 26. Generación y caracterización de células CB-NK CAR. ....	127
Figura 27. La actividad citolítica in vitro de las células NK-92MI CAR frente a líneas celulares de MM es similar a la de las células CB-NK CAR. ....	129
Figura 28. Las células CB-NK BCMA CAR superan en eficacia anti-MM a las células CB-NK NKG2D CAR. ....	135
Figura 29. El pretratamiento con la combinación BTZ+GSI potencia la inhibición de proteasoma, aumenta la expresión de ligandos de NKG2D y sensibiliza a la terapia NKG2D CAR a las líneas de MM resistentes a BTZ. ....	140
Figura 30. Detección de daño, señalización y parada de ciclo por tratamiento con BTZ+GSI sobre líneas de MM resistentes a BTZ. ....	143

Figura 31. Fenotipo senescente y activación de la ruta de NF- $\kappa$ B en células de MM resistentes a BTZ tratadas con BTZ+GSI.....	147
Figura 32. Potenciación in vivo de la actividad citotóxica de las células CB-NK NKG2D CAR mediante el pretratamiento de las células de MM con BTZ+GSI.....	149
Figura 33. Mecanismo de acción propuesto de bortezomib en combinación con inhibidores de gamma secretasas sobre células de MM resistentes. ....	170

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación de riesgo en los pacientes con mieloma múltiple. ....	16
Tabla 2. Manifestaciones clínicas del MM. ....	23
Tabla 3. Nuevos tratamientos para el MM/RR. ....	46
Tabla 4. Ensayos clínicos registrados actualmente con células NK-CAR para enfermedades hematológicas. ....	59
Tabla 5. Reactivos y anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la caracterización celular por citometría de flujo. ....	87
Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la caracterización celular por western-blot. ....	92
Tabla 7. Características de los pacientes de MM al diagnóstico o en recaída. ....	108
Tabla 8. Características de los pacientes de MM al diagnóstico o en recaída. ....	127
Tabla 9. Estudio de la compatibilidad KIR-HLA entre la línea celular de MM U266 y las células CB-NK de los donantes utilizados en el experimento in vivo anterior. ....	136
Tabla 10. Estudio de la compatibilidad HLA-KIR entre la línea celular de MM ARP1 KO R16 y las células CB-NK de los donantes utilizados en el experimento in vivo anterior. ....	150



# **1. RESUMEN/ABSTRACT**





# Desarrollo preclínico de la inmunoterapia adoptiva con células NK-CAR alogénicas para el tratamiento de mieloma múltiple refractario y en recaída

## Introducción

El mieloma múltiple es una enfermedad neoplásica que constituye aproximadamente el 10% de todos los tumores hematológicos y el 1,8% de todas las neoplasias. Se caracteriza por la proliferación clonal de células plasmáticas patológicas, acumuladas principalmente en MO, enfermedad lítica ósea y una severa inmunosupresión, sobre todo en etapas avanzadas de la enfermedad. A pesar de los avances en el tratamiento del mieloma en la última década, el MM sigue siendo una enfermedad incurable, donde la mayoría de pacientes recaen con periodos de respuesta cada vez más cortos. Por esta razón, existe la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas basadas en distintos mecanismos de acción para superar este escenario de recaídas y refractariedad a los tratamientos actuales.

La terapia T CAR autóloga es una terapia innovadora que ha logrado resultados impresionantes en neoplasias de células B, incluido MM/RR, que ha llevado a la aprobación de dos productos en el mercado. La experiencia con células T CAR comerciales revelan limitaciones como toxicidades graves, producción larga y costosa, y con un control de la enfermedad subóptimo en muchos pacientes. Por otra parte, pacientes que recaen a las terapias aprobadas T CAR BCMA no tienen muchas más opciones terapéuticas. Por tanto, se requieren estrategias alternativas o secuenciales a las terapias T CAR BCMA. Las células NK-CAR emergen como un abordaje terapéutico a menor coste y mucho más seguro, sin generar EICH, citopenias prolongadas, CRS o neurotoxicidades graves.

Aunque se ha demostrado previamente la eficacia preclínica de las células autólogas NK CAR en MM, una plataforma alogénica universal NK CAR puede suponer una opción más traslacional, más rápida y a menor coste, como la obtenida con la línea celular NK-92MI o células NK expandidas y activadas de cordón umbilical (CB-NK).

A parte de BCMA, se están estudiando otras dianas terapéuticas, como CS1, CD38 o CD138, que pueden inducir fratricidio o toxicidad fuera del tumor, respectivamente. Se conoce que más del 85% de los tumores, incluido MM, expresan al menos uno de los ocho ligandos de NKG2D en su membrana. Sin embargo, no se han observado respuestas

objetivas en pacientes con MM tratados con células T CAR NKG2D por falta de persistencia asociada a la expresión de los ligandos en la membrana.

Explorar terapias que aumenten la densidad de los ligandos de NKG2D, en combinación con la inmunoterapia NK CAR NKG2D, podría suponer una nueva estrategia para el tratamiento del MM/RR.

## Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es generar una inmunoterapia eficaz para el tratamiento de pacientes de MM/RR: i) obtener células NK alogénicas transducidas con los CAR NKG2D o BCMA; ii) comparar la eficacia de estas poblaciones NK CAR alogénicas, y cuando se usan estos CAR en combinación; iii) potenciar la eficacia de la terapia NKG2D CAR con el efector inmune más eficaz obtenido en la comparación anterior, en un modelo de resistencia a BTZ y recaída tras las terapias anti-BCMA; iv) estudiar los mecanismos por los que se incrementa la inmunogenicidad a los tratamientos con los efectores inmunes NK CAR estudiados, a través del aumento de ligandos de estrés en las células de MM.

## Resultados

Nuestros resultados indican que la expresión de los CAR NKG2D o BCMA en las células NK-92MI aumenta la actividad antitumoral de las células parentales frente a líneas celulares y células primarias de MM in vitro. La presencia de NKG2D-L solubles no bloquea la actividad lítica de las células NK-92MI NKG2D CAR, mientras que concentraciones patológicas de BCMA soluble inhiben la citotoxicidad de las células NK-92MI BCMA CAR. Además, la coexpresión de ambos CAR NKG2D y BCMA en las células NK-92MI no produce un aumento sinérgico en su actividad lítica, aunque sí una cobertura citotóxica sobre sus dianas in vitro. De forma relevante, ninguno de los tratamientos NK-92MI CAR muestra toxicidad hematológica frente a PBMCs de donantes sanos.

En cuanto a la comparación entre terapias NK-CAR alogénicas, las células NK-92MI CAR y CB-NK CAR presentan una actividad lítica similar in vitro frente a células de MM. Sin embargo, la irradiación a dosis clínicas de las células NK-92MI CAR elimina por completo su eficacia antitumoral in vivo en todos nuestros esquemas de tratamiento, tanto con administraciones desde 48 horas hasta semanales, con dosis acumuladas de

hasta  $64 \times 10^6$  células por ratón. Estrategias como la reducción de dosis de irradiación en los efectores NK-92MI CAR o la expresión de un interruptor suicida no asegura el control de su proliferación en los animales.

Por otro lado, las células CB-NK BCMA CAR superan en eficacia a las células CB-NK NKG2D CAR porque muestran mayor potencia de lisis in vitro sobre células primarias de MM y, aunque ambas células CB-NK CAR producen respuestas en el modelo de ratón establecido, las obtenidas con BCMA CAR son más persistentes. Tanto CB-NK NKG2D CAR como BCMA CAR muestran ausencia de toxicidad hematológica frente a PBMCs de donantes sanos.

Por otra parte, para conseguir explotar el potencial de traslación de las células NK NKG2D CAR en este trabajo se ha propuesto su uso en un modelo de resistencia a bortezomib y terapia anti-BCMA. Los resultados indican que el pretratamiento con BTZ y Crenigacestat, seguido de tratamiento con células NK NKG2D CAR puede eliminar células resistentes in vitro y aumentar la duración de las respuestas in vivo. Los tratamientos con Bortezomib y Crenigacestat a las dosis que sensibilizan a las células de MM no producen toxicidad hematológica sobre PBMCs de donantes sanos.

El mecanismo de sensibilización con BTZ y Crenigacestat consiste en el aumento de la expresión de ligandos de estrés (NKG2D-L) en la célula mielomatosa. La sobreexpresión de los NKG2D-L se relaciona con la señalización de la respuesta a daño por dobles roturas en el ADN (DDR), reflejado en un aumento en la forma fosforilada de la histona H2AX. La señalización DDR ligada a las dobles roturas es concomitante a la expresión de p21 y está mediada fundamentalmente por el controlador de ciclo celular Chk2, porque la inhibición específica de su actividad revierte parcialmente la sobreexpresión de NKG2D-L en membrana. El disparo de la DDR se relaciona también con la inducción de senescencia, la activación de la ruta NF- $\kappa$ B y la producción de citoquinas asociadas a senescencia, como IL-8, en células tratadas con la combinación BTZ y Crenigacestat.

## Conclusiones

En conjunto, hemos generado y comparado la actividad citotóxica de dos poblaciones de células NK CAR alogénicas que expresan dos CAR relevantes en la clínica del MM: NKG2D y BCMA CAR. In vitro, las células NK-92MI CAR y CB-NK CAR exhiben potencias citotóxicas muy similares. Sin embargo, la irradiación obligatoria de las células

NK-92MI CAR elimina por completo su eficacia in vivo. Por el contrario, las células CB-NK CAR presentan actividad anti-MM in vivo, pero las respuestas son más persistentes en los ratones tratados con células CB-NK BCMA CAR.

Asimismo, la eficacia de la inmunoterapia CB-NK NKG2D CAR puede ser potenciada sensibilizando a las células de MM mediante el tratamiento farmacológico con Bortezomib y Crenigacestat, induciendo la sobreexpresión de NKG2D-L mediada por daño genotóxico en el ADN y senescencia en estas células, en un modelo de resistencia a Bortezomib y a terapias anti-BCMA. Los NKG2D-L se expresan hasta en el 85% de los tumores y son potencialmente inducibles por esta combinación, por lo que la aproximación propuesta para aumentar la vulnerabilidad no se circunscribe solo al MM/RR y podría implementarse en diversas neoplasias en el escenario de resistencia a fármacos que dañan el ADN. En este contexto, las células CB-NK NKG2D CAR se comportan como un tratamiento senolítico. Desde nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de células NK CAR actuando como una terapia senolítica en cáncer.

# Preclinical development of adoptive immunotherapy with allogeneic CAR-NK cells for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma

## Introduction

Multiple myeloma is a neoplastic disease that constitutes approximately 10% of all hematologic tumors and 1.8% of all neoplasms. It is characterized by clonal disease of pathological plasma cells, accumulated mainly in bone marrow, lytic bone lesions, and severe immunosuppression, especially in advanced stages of the disease. Despite advances in the treatment of myeloma in the last decade, MM remains incurable, where most patients relapse with increasingly shorter response periods. For this reason, there is an unmet need to find new therapeutic options based on different mechanisms of action to overcome this scenario of relapses and refractoriness to current treatments.

Autologous CAR T therapy is an innovative therapy that has achieved impressive results in B-cell neoplasms, including RR/MM, leading to the approval of two products on the market. Experience with commercial CAR T cells reveals limitations such as severe toxicities, time-consuming and expensive production, and suboptimal disease control in many patients. On the other hand, patients receiving the approved BCMA CAR T therapies do not have many other therapeutic options. Therefore, alternative or sequential strategies to BCMA CAR T therapies are required. CAR NK cells are emerging as a lower cost and much safer therapeutic approach, without generating GVHD, prolonged cytopenias, CRS or severe neurotoxicity.

Although preclinical efficacy of autologous CAR NK cells in MM has been previously demonstrated, a universal allogeneic CAR NK platform may provide a more translational, faster, and lower-cost option, such as that obtained with the NK-92MI cell line or expanded and activated NK cells from umbilical cord blood (CB-NK).

Apart from BCMA, other therapeutic targets are being studied, such as CS1, CD38 or CD138, which can induce fratricide or toxicity outside the tumor, respectively. It is known that more than 85% of tumors, including MM, express at least one of the eight NKG2D ligands on their membrane. However, objective responses have not been observed in MM patients treated with NKG2D CAR T cells due to lack of persistence associated with the expression of the ligands on the membrane.

Exploring therapies that increase the density of NKG2D ligands, together with NKG2D CAR NK immunotherapy, could mean a new strategy for the treatment of RR/MM.

## Objectives

The main objective of this work is to generate an effective immunotherapy for the treatment of RR/MM patients: i) to obtain allogeneic NK cells transduced with CAR NKG2D or BCMA; ii) to compare the efficacy of these allogeneic CAR NK populations, and when these CARs are used in combination; iii) to enhance the efficacy of NKG2D CAR therapy with the most effective immune effector obtained in the previous comparison, in a model of resistance to BTZ and relapse after anti-BCMA therapies; iv) to study the mechanisms by which the immunogenicity of treatments is increased with the studied CAR NK immune effectors, through the increase in stress ligands in MM cells.

## Results

Our results indicate that NKG2D or BCMA CAR expression in NK-92MI cells increases the antitumor activity of parental cells against cell lines and primary MM cells in vitro. The presence of soluble NKG2D-L does not block the lytic activity of NKG2D CAR NK-92MI cells, while pathological concentrations of soluble BCMA inhibit the cytotoxicity of BCMA CAR NK-92MI cells. In addition, the coexpression of both NKG2D CAR and BCMA in NK-92MI cells does not produce a synergy in lytic activity, but it does produce cytotoxic coverage on its targets in vitro. Relevantly, none of the CAR NK-92MI treatments show haematological toxicity against PBMCs from healthy donors.

Regarding the comparison between allogeneic CAR NK therapies, CAR NK-92MI and CAR CB-NK cells show similar lytic activity in vitro against MM cells. However, irradiation of CAR NK-92MI cells at clinical doses completely eliminates their antitumor efficacy in vivo in all our treatment schedules, both with administrations from 48 hours to weekly, with cumulative doses up to  $64 \times 10^6$  cells per mouse. Strategies such as reducing the irradiation dose in CAR NK-92MI effectors or the expression of a suicide switch do not ensure the control of their proliferation in animals.

On the other hand, BCMA CAR CB-NK cells outperform NKG2D CAR CB-NK cells efficiency because they show greater lysis potency in vitro over primary MM cells and, although both CAR CB-NK cells exhibit responses in the established mouse model, those

obtained with BCMA CAR are more persistent. Both NKG2D CAR and BCMA CAR CB-NK show no haematological toxicity against PBMCs from healthy donors.

On the other hand, in order to exploit the translational potential of NKG2D CAR NK cells, their use in a model of resistance to bortezomib and anti-BCMA therapies has been proposed. The results indicate that pretreatment with BTZ and Crenigacestat, followed by treatment with NKG2D CAR NK cells can kill resistant cells *in vitro* and increase the duration of responses *in vivo*. Treatments with Bortezomib and Crenigacestat at doses that sensitize MM cells do not produce hematological toxicity on PBMCs from healthy donors.

The sensitization mechanism with BTZ and Crenigacestat consists of the increased expression of stress ligands (NKG2D-L) in myeloma cells. The overexpression of NKG2D-L is associated with the signaling of damage response by double breaks in DNA, reflected in an increase in the phosphorylated form of histone H2AX. The DDR signaling associated with double breaks is concomitant to the expression of p21 and is mainly mediated by cell cycle controller Chk2, because the specific inhibition of its activity partially reverses the overexpression of NKG2D-L in the membrane. The firing of DDR is also associated with the induction of senescence, with the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and with the production of cytokines associated with senescence, such as IL-8, in cells treated with the combination BTZ and Crenigacestat.

## Conclusions

Taken together, we have generated and compared the cytotoxic activity of two allogeneic CAR NK populations expressing two MM-relevant CAR in the clinic: NKG2D and BCMA CAR. *In vitro*, CAR NK-92MI and CAR CB-NK cells exhibit very similar cytotoxic potencies. However, mandatory irradiation of CAR NK-92MI cells completely abrogates their *in vivo* efficacy. In contrast, CAR CB-NK cells exhibit anti-MM activity *in vivo*, but responses are more persistent in mice treated with BCMA CAR CB-NK cells.

Likewise, the efficacy of NKG2D CAR CB-NK immunotherapy can be enhanced by sensitizing MM cells through drug treatment with Bortezomib and Crenigacestat, inducing NKG2D-L overexpression mediated by genotoxic DNA damage and senescence in these cells, in a model of resistance to Bortezomib and anti-BCMA therapies. NKG2D-L are expressed in up to 85% of tumors and are potentially inducible by this combination. The proposed approach to increase vulnerability is not limited to MM/RR alone and could



be implemented in different neoplasms in the scenario of resistance to drugs that damage DNA. In this context, NKG2D CAR CB-NK cells behave as a senolytic treatment. To our knowledge, this is the first description of CAR NK cells acting as a senolytic therapy in cancer.

## **2. INTRODUCCIÓN**

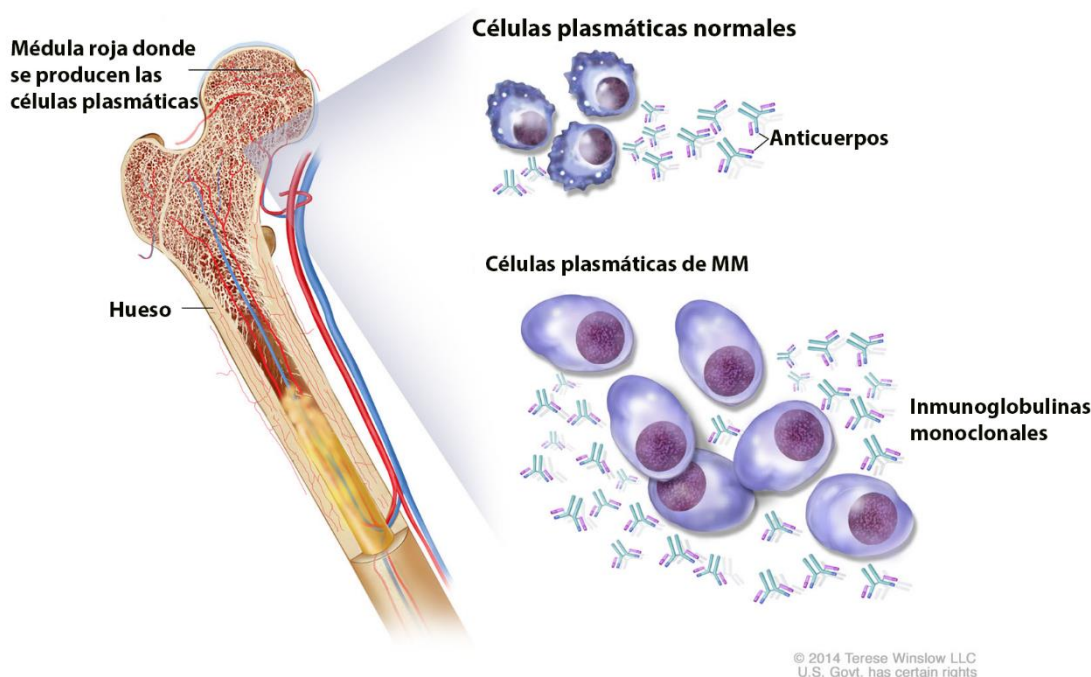


## 1. MIELOMA MÚLTIPLE

### 1.1. Definición y aspectos generales

El mieloma múltiple (MM) es una gammapatía monoclonal que se caracteriza por la proliferación y acumulación descontrolada de células plasmáticas (CP) clonales en la médula ósea (MO). Estas células plasmáticas malignas producen y secretan una inmunoglobulina (Ig) (Fig. 1), generalmente IgG (en el 50-60% de los casos) o IgA (30%), denominada proteína monoclonal, componente monoclonal o pico M por el aspecto que muestra cuando es detectado mediante una prueba de electroforesis [1]. El componente monoclonal puede estar constituido por una Ig completa o por un fragmento de esta (cadenas ligeras kappa o lambda). En el 97% de los pacientes las cadenas ligeras pueden liberarse a suero y excretarse en la orina por su bajo peso molecular [2]. La presencia de cadenas ligeras libres en orina se denomina proteinuria de Bence-Jones. El 15-20% de los pacientes presenta un MM de cadenas ligeras, caracterizado por la secreción de cadenas ligeras kappa o lambda en lugar de una Ig completa [3]. En el 1-2% de los casos no se detecta componente monoclonal ni en sangre ni en orina, lo que se denomina MM no secretor. Se ha demostrado también la existencia de los mielomas biclonales (frecuencia del 2%), donde se cuantifican dos componentes monoclonales, con cadenas pesadas y ligeras que pueden ser iguales o diferentes entre sí [4].

El primer caso documentado de mieloma múltiple fue reportado en el año 1844 por Samuel Solly en una paciente que experimentaba dolor severo de espalda y extremidades, la autopsia reveló severas fracturas [5]. Un año después, Henry Bence Jones describió una nueva forma de proteinuria en un tendero inglés con huesos frágiles y fracturas patológicas, y no fue hasta el año 1850 cuando a la excreción en orina de gran cantidad de proteína se le denominó proteinuria de Bence-Jones [6]. Solly, Bence Jones y otros médicos describieron las características de la enfermedad, conocida entonces como “mollities ossium” (huesos blandos y frágiles), posteriormente denominada mieloma múltiple por Rustizky [5]. El mieloma múltiple afecta a distintas localizaciones de la médula ósea, de ahí su denominación: “mieloma” porque se origina en la médula ósea, y “múltiple” porque afecta a distintas zonas del esqueleto axial, especialmente los huesos de la columna vertebral, costillas, cráneo o pelvis, entre otros.



**Figura 1.** Las células plasmáticas de MM secretan inmunoglobulinas monoclonales.

Acumulación anormal de células plasmáticas clonales en la médula ósea que producen una inmunoglobulina monoclonal. Imagen adaptada de Terese Winslow LLC 2014.

## 1.2. Epidemiología y etiología

El MM representa el 1,8% de todas las neoplasias malignas y alrededor del 10% de todos los tumores hematológicos, siendo el más común después del linfoma [7]. En Europa, la incidencia es de 4,5-6 nuevos casos por cada 100 000 habitantes por año, por lo que se diagnostican alrededor de 38 000 nuevos casos de MM al año en Europa, y la mortalidad se sitúa en 3,2 por cada 100 000 habitantes al año [8]. En general, el MM es ligeramente más común en hombres que en mujeres, resultando dos veces más común en población negra americana que en población blanca [9]. La edad media al diagnóstico se sitúa en 66 años, aunque con rara frecuencia se da en pacientes más jóvenes menores de 40 años (2%) [10] y en menores de 30 años (0,02-0,3%) [11].

Actualmente, se desconocen las causas que desencadenan el MM. Se ha relacionado con factores como la radiación ionizante [12, 13], aunque no se ha podido asociar al tratamiento radioterápico [14]. También se ha descrito como otro factor un aumento del riesgo ante la exposición a herbicidas o insecticidas como benceno y otros solventes orgánicos [15], no obstante, se necesita más evidencia para establecer una conexión con

el desarrollo de la enfermedad. Aunque el MM es una neoplasia esporádica, estudios de casos en familias [16] revelan la base genética hereditaria en la que pacientes emparentados presentan entre 2-4 veces más riesgo de desarrollar esta enfermedad [17]. Hasta en el 10% de los pacientes de MM se han reportado mutaciones de línea germinal en algunos genes, como es el caso de *DIS3* [18]. Algunos virus como el de la hepatitis B [19] o hepatitis C [20], así como la obesidad o un estatus de inflamación crónica con una estimulación antigénica sostenida [21] se han postulado también como desencadenantes del MM. De hecho, Nair y col. sostienen que la proteína monoclonal reconoce lípidos similares a los que se producen en exceso en la enfermedad de Gaucher en un porcentaje relevante de los pacientes con GMSI (33%) [22].

### 1.3. Estadificación de los pacientes y pronóstico: evaluación del riesgo en MM

El sistema de estadiaje Durie–Salmon (clasificación por etapas de la enfermedad) que se venía utilizando tradicionalmente fue sustituido por el Sistema de Estadiaje Internacional para el mieloma múltiple, que establece los valores de beta 2-microglobulina y albúmina para clasificar el riesgo en la enfermedad [23, 24]. Este ISS fue revisado (R-ISS) en 2015 e incluyó los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y las alteraciones citogenéticas de alto riesgo (Tabla 1).

Niveles elevados de proteína C reactiva o LDH indican enfermedad activa, en concreto la elevación de LDH es un factor de mal pronóstico y aparece entre el 10 y el 15% de los casos. Entre los posibles eventos iniciadores de MM se encuentran cambios genéticos y epigenéticos, como alteraciones cromosómicas asociadas a pronósticos menos favorables, por ejemplo translocaciones  $t(4;14)$ ,  $t(14;16)$  o  $t(14;20)$  [24]. Esas alteraciones cromosómicas están asociadas a la desregulación de genes del ciclo celular, alteración en las vías de señalización (MAPK, NF- $\kappa$ B) y en la metilación del ADN, en la sobreexpresión de *MYC* y en mutaciones en los oncogenes *RAS*, que se asocian a la progresión de la enfermedad [25].

Pacientes frágiles con comorbilidades, fracaso renal o edad avanzada, o pacientes con enfermedad extramedular o células mielomatosas en sangre periférica presentan también peor pronóstico [26].

Sistema de estadiaje internacional (ISS)	
Parámetros de laboratorio	Supervivencia media (meses)
<b>Estadio I:</b> niveles de $\beta 2$ -microglobulina $<3,5\text{mg/l}$ y albúmina sérica $\geq 3,5\text{g/dl}$	62
<b>Estadio II:</b> No se ajusta a estadio I ni III	44
<b>Estadio III:</b> niveles de $\beta 2$ -microglobulina $\geq 5,5\text{mgdl}$	29
Sistema de estadiaje internacional revisado (R-ISS)	
Parámetros de laboratorio	Supervivencia global a 5 años
<b>Estadio I:</b> estadio I del ISS además de niveles normales de LDH y marcadores citogenéticos de riesgo estándar detectados mediante FISH	82%
<b>Estadio II:</b> No se ajusta a estadio I ni III	62%
<b>Estadio III:</b> estadio III del ISS además de niveles de LDH más altos de lo normal o marcadores citogenéticos de alto riesgo detectados mediante FISH (como $t(4;14)$ , $t(14;16)$ y $del(17p)$ )	40%
Otros factores pronósticos	
Número de CPs circulantes, enfermedad extramedular, alta tasa de proliferación de las CPs, presencia de mutaciones en TP53, fallo renal, inmunoparesia	

**Tabla 1.** Estadificación de riesgo en los pacientes con mieloma múltiple.

LDH: lactato deshidrogenasa; FISH: hibridación fluorescente in situ. Adaptada de Kumar, Rajkumar, Kyle et al. Multiple myeloma. Nat Rev Dis Primers 3, 17046 (2017). [27]

Recientemente, en 2022 se ha añadido una nueva actualización, el R2-ISS, que adicionalmente considera la ganancia del cromosoma 1q y la presencia de más de una alteración citogenética de alto riesgo. Además, ya no considera la translocación  $t(14;16)$  en esta clasificación. La finalidad de esta nueva clasificación es poder estratificar de manera más certera y poder discriminar a los pacientes de riesgo intermedio (estadio II), asignando una puntuación para definir el riesgo [28]. El R2-ISS estratifica a los pacientes asignándoles una puntuación a las siguientes variables pronósticas: se asigna un punto si el paciente corresponde al ISS II, tiene  $del(17p)$ , LDH alto o  $t(4;14)$ ; se asigna 1,5 puntos si pertenece a ISS III; y se asignan 0,5 puntos cuando presenta la ganancia 1q+. La suma de estas puntuaciones indica en qué grupo de riesgo se sitúa el paciente: grupo I de bajo riesgo (0 puntos), II riesgo bajo/intermedio (0,5-1 puntos), III riesgo intermedio/alto (1,5-2,5 puntos) y grupo IV de alto riesgo [29].

#### 1.4. Fisiopatogenia

Las CP clonales que causan el MM derivan de células B post-centro germinales que tras la exposición a un antígeno experimentan un reordenamiento VDJ por el que se genera

un repertorio de Ig primarias. Estas células B que expresan en su superficie un complejo IgH-IgL (Ig cadena pesada-ligera) migran a los órganos linfoides secundarios y sufren diferentes procesos tales como maduración por afinidad, hipermutación somática y recombinación de cambio de clase [30, 31] (Fig. 2A).

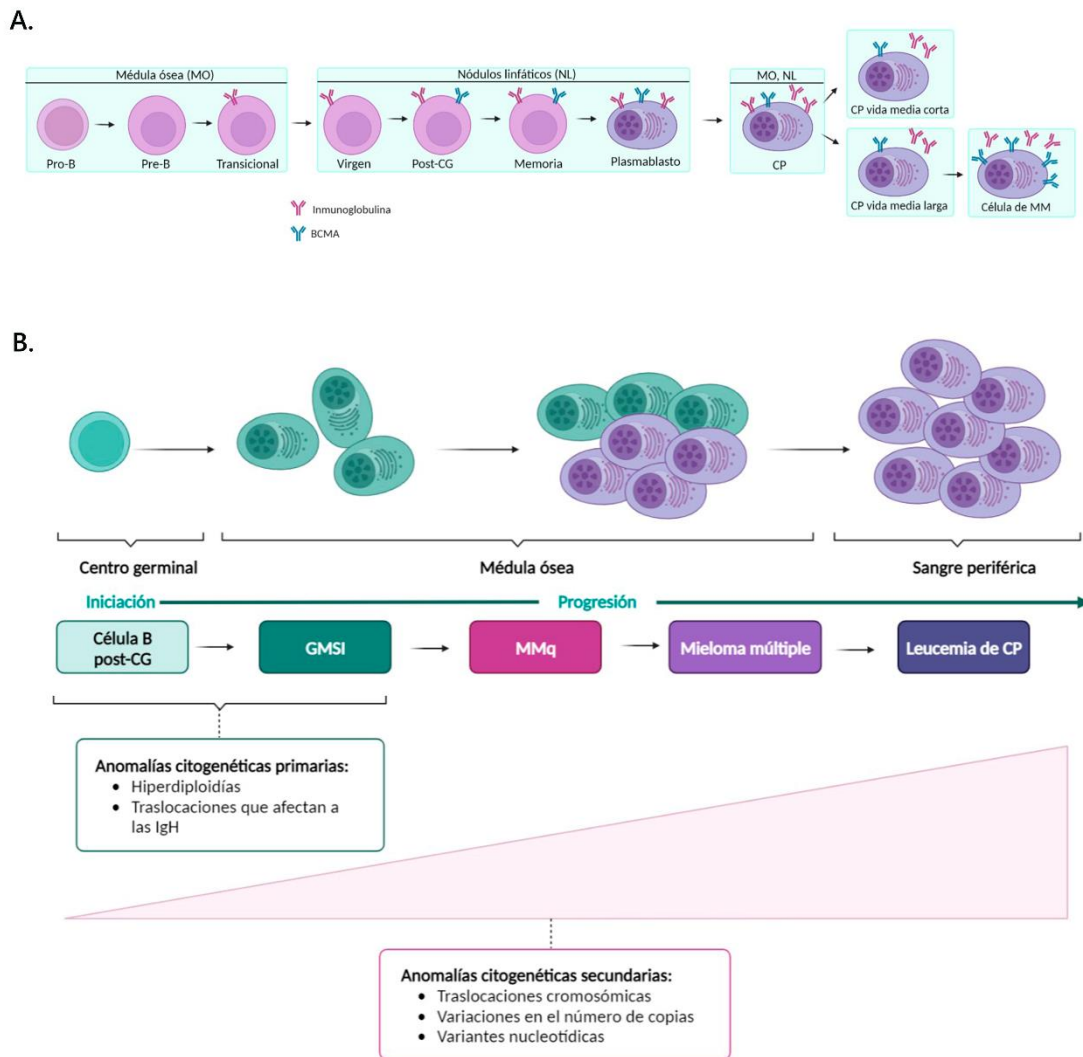
El MM en la mayoría de los casos viene precedido por un estado premaligno denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI). La GMSI es un estadio asintomático, y estos pacientes tienen una probabilidad de evolucionar a MM en una proporción de un 1% por año [26]. En algunos sujetos, la enfermedad se manifiesta en un estado más avanzado que GMSI denominado MM quiescente (MMq) o asintomático, que puede progresar a mieloma activo o sintomático a una tasa de 10% por año, durante los cinco primeros años desde su diagnóstico, después, la tasa de progresión se estabiliza en un 3-5% por año [32]. Los factores de riesgo de progresión a MM sintomático incluyen, aunque no se limitan a, alta concentración de proteína monoclonal en suero, isotipo IgA, alta infiltración de CP en médula ósea, alta proporción de cadenas ligeras libres (FLC) en suero, inmunoparesia y la presencia de más del 95% de CP malignas en MO [33]. En las fases más avanzadas de la enfermedad las CP de MM pueden empezar a proliferar fuera de la MO. En el caso de que lo hagan en sangre periférica y se detecten en una frecuencia  $\geq 5\%$  se define como leucemia de células plasmáticas [34].

Durante la etapa de establecimiento de GMSI se producen anomalías citogenéticas primarias en las que las células de mieloma adquieren hiperdiploidías o translocaciones que afectan a los genes IgH (Fig. 2B). Mientras que en las siguientes etapas de la enfermedad las células adquieren anomalías citogenéticas secundarias como translocaciones cromosómicas, variaciones en el número de copias y variantes nucleotídicas [25]. Ambas anomalías citogenéticas primarias y secundarias influyen en el curso de la enfermedad y la respuesta a la terapia [24].

Entre las anomalías citogenéticas primarias más frecuentes se encuentran las hiperdiploidías, como trisomías en los cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y/o 21, y translocaciones de IgH que en la mayoría de los casos implican el locus 14q32, que afecta a la expresión de genes clave como la ciclina D1, *FGFR3* o la desregulación de *MYC* [35]. Las anomalías citogenéticas secundarias más frecuentes comprenden variaciones en el número de copias como amplificación del cromosoma 1q o deleciones cromosómicas, como la del cromosoma 17p que afecta al gen *TP53* [36], o la del 13q que



afecta a *BRCA2* o *RBI*; también son frecuentes alteraciones epigenéticas como la hipermetilación del ADN (ej. *CDKN2B* o *CDKN2A*) [37], modificaciones postraduccionales como metilación o acetilación de histonas, o la expresión anormal de micro-ARNs [38]. Son comunes las alteraciones genéticas como reordenamientos secundarios, sobreexpresión de *Myc* y mutaciones en genes como *NRAS*, *KRAS*, *BRAF* o *EGR1* [39]. En el 15% de los pacientes se observan mutaciones en genes de vías de reparación del ADN, como *ATR*, *ATM* y *ZFH4* [40]. También se han reportado mutaciones en genes de la ruta de NF- $\kappa$ B, por ejemplo, *TRAF3*, *LTB* o *CYLD* [41].



**Figura 2. Maduración de las células B y evolución clonal.**

A) Proceso de maduración de las células B. B) Progresión del mieloma múltiple. Eventos genéticos primarios y secundarios involucrados en la transformación y progresión hacia MM. Post-CG: célula B post-centro germinal; CP: célula plasmática; GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto; MMq: mieloma múltiple quiescente o asintomático. Imagen adaptada de Cho S-F, et al. *Front Immunol.* 2018; 9:1821; y Kumar, S., Rajkumar. et al. *Multiple myeloma.* *Nat Rev Dis Primers* 3, 17046 (2017).

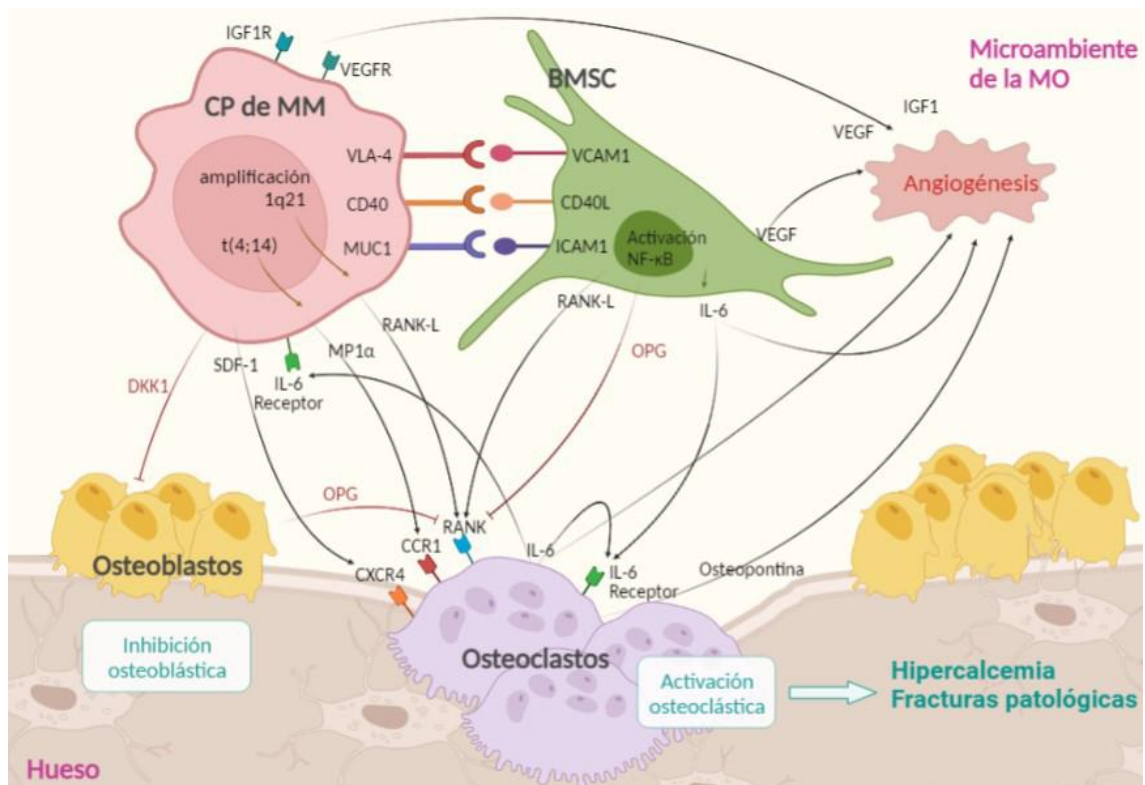
Junto con las alteraciones genéticas y epigenéticas ya mencionadas, las interacciones entre las CP de MM y el microambiente desempeñan un papel importante en la patogénesis del MM. La progresión del MM, así como la respuesta a los tratamientos, se encuentran muy ligados al complejo microambiente medular (Fig. 3). La interacción de las células mielomatosas con las células estromales de la MO (BMSC), las proteínas de la matriz extramedular (como integrinas, cadherinas, selectinas y moléculas de adhesión celular) y factores solubles (ej. citoquinas, factores de crecimiento, etc.) facilitan el crecimiento tumoral, supervivencia, migración y resistencia a fármacos, así como la generación de un entorno inmunosupresor y pro-inflamatorio [42].

La interacción entre las células de MM y el nicho ocurre a través de numerosas moléculas de adhesión entre las que se encuentran ICAM-1 y VCAM-1 en las células BMSC y las integrinas  $\alpha$  y  $\beta$ 1 (VLA-4, 5 y 6) en las células de mieloma, además de otras moléculas expresadas en las células mielomatosas (ej. CD138, CD38 o CD44) [43]. Las células BMSC promueven la producción de citoquinas como SDF-1, que se une a su receptor CXCR4 promoviendo la movilización de las CP dentro de la MO [44], interleuquina (IL)-6, IGF-1, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-10 y factores de crecimiento como VEGF, que estimulan la proliferación de las CP, anti-apoptosis, osteoclastogénesis, neo-angiogénesis y resistencia a fármacos [43].

Además, las células de MM también interactúan directamente con los osteoclastos y osteoblastos. Las BMSC y los osteoblastos regulan la osteoclastogénesis a través de la producción del ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) y osteoprotegerina [44]. RANKL se une a su receptor RANK en los osteoclastos y, en condiciones normales, la osteoprotegerina actúa como señuelo uniéndose a RANKL para regular la actividad osteoclástica [45]. Pero en MM este equilibrio es interrumpido por la unión de las células de MM y BMCS a través de VCAM1/VLA-4, que favorece el aumento de la expresión de RANKL y disminución de la expresión de OPG, promoviendo la osteólisis [43]. Además, otros mecanismos contribuyen a la resorción ósea, las células de MM secretan la proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  que se une a CCR1 en los osteoclastos, y las alteraciones cromosómicas pueden conllevar a una sobreproducción de receptores en las células de MM favoreciendo a su vez la producción de IL-6, promoviendo la actividad osteoclástica [45]. Otros factores liberados por las células tumorales, como Dickkopf 1, son inhibidores potentes de la función de los osteoblastos.

El efecto neto es un desbalance entre la actividad osteoclástica y osteoblástica, lo que provoca hipercalcemia y fracturas patológicas [45] (Fig. 3).

A medida que progresa la enfermedad, el nicho se vuelve hipóxico, lo que reduce CXCL12 (SDF-1, ligando del receptor CXCR4) y favorece la movilización de las CP malignas fuera de la MO, hacia la circulación sanguínea [43].



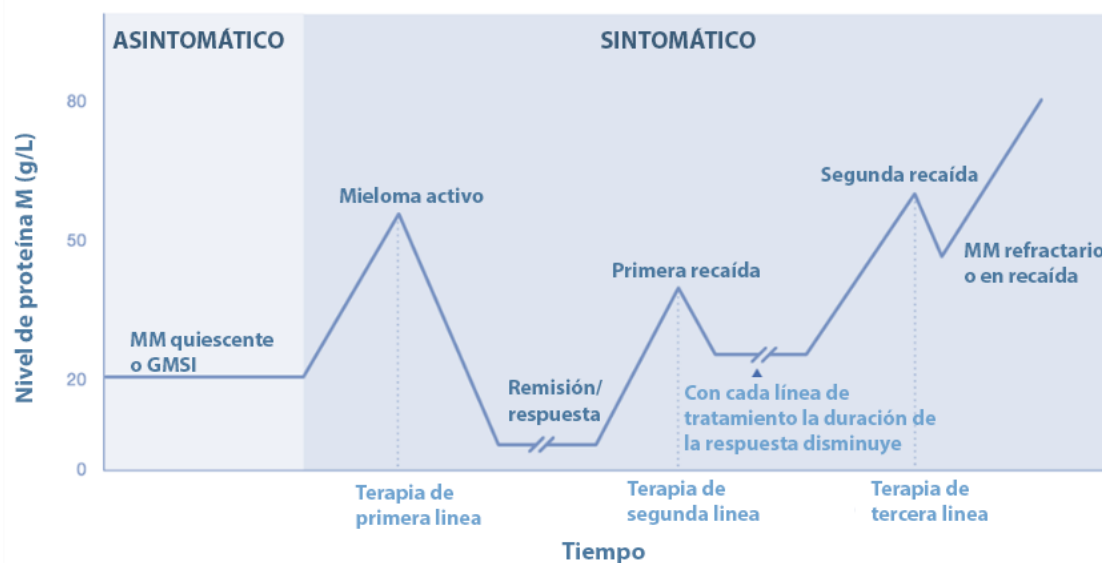
**Figura 3. Fisiopatología del mieloma múltiple.**

MO, médula ósea; CP, célula plasmática; BMSC, célula estromal de MO; CCR1, receptor de quimiocinas 1; CD40L, CD40 ligando; ICAM1, molécula de adhesión intercelular 1; IGF1, factor de crecimiento insulínico tipo 1; IGF1R, receptor de IGF1; MP1 $\alpha$ , proteína inflamatoria de macrófagos 1  $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B, factor nuclear  $\kappa$ B; DKK1, dickkopf homólogo 1; SDF-1, factor 1 derivado de células estromales; VCAM1, molécula 1 de adhesión a células vasculares; VLA-4, integrina Alpha 4; RANK, receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B; RANK-L, RANK ligando; OPG, osteoprotegerina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR, receptor de VEGF. Adaptada de Palumbo, Anderson. Multiple myeloma. N Engl J Med. 2011 Mar 17;364(11):1046-60. [45]

### 1.5. Evolución clínica

El curso típico de la enfermedad se caracteriza por un patrón de remisión y recaída, con una disminución progresiva de la duración de las respuestas y un incremento del número de tratamientos de rescate [46] (Fig. 4).

Gracias a los avances terapéuticos en los últimos 15 años la supervivencia global (SG) a 5 años ha pasado del 32,1% al 57,9%, según el Instituto Nacional de Salud [47], con una supervivencia media general actual de 6 años [48]. Sin embargo, el MM sigue considerándose una enfermedad incurable, por tanto, se requieren nuevas estrategias terapéuticas para incrementar el tiempo de respuesta y permitan controlar la enfermedad o alcanzar la curación [46], ya que una respuesta profunda duradera se ha asociado a una mayor supervivencia [45].



**Figura 4. Evolución clínica del MM.**

Imagen adaptada de Borrello. Leuk Res. 2012 Nov [46].

El MM se caracteriza por la presencia de los síntomas CRAB (del inglés *hypercalcemia, renal failure, anemia and bone lesions*), que hacen referencia a la aparición de hipercalcemia (calcio > 11,5mg/dL), fallo renal (creatinina > 2 mg/dL), anemia (hemoglobina < 10g/dL o disminución de 2 g/dL respecto al límite inferior de normalidad) y lesiones líticas en las zonas óseas [49]. La mayor parte de las manifestaciones clínicas del MM derivan de la presencia de grandes cantidades de componente monoclonal y de la acumulación de células plasmáticas en médula ósea y otros tejidos (Tabla 2). Con frecuencia se produce un fallo renal en los pacientes a causa de los efectos tóxicos del depósito de cadenas ligeras sobre los túbulos renales, principalmente [50]. La destrucción ósea inducida por el microambiente tumoral provoca un aumento de la resorción ósea por los osteoclastos [51], lo que produce a su vez una

hipercalcemia. Además, la destrucción ósea es la mayor causa de morbilidad en MM y a menudo se asocia a dolor óseo severo, lesiones osteolíticas y osteoporosis [52].

La acumulación de CP en la MO conlleva a la producción disminuida de eritrocitos, provocando anemia y una deficiencia relativa de eritropoyetina [53]. El 75% de los pacientes presenta al diagnóstico la supresión de una o más inmunoglobulinas, lo que se denomina inmunoparesia o hipogammaglobulinemia [54], por lo que los pacientes de mieloma presentan alto riesgo de complicaciones infecciosas [55]. Además, existe una respuesta de anticuerpos disminuida debido a la actividad de los monocitos supresores así como defectos en la función del complemento y los granulocitos [56]. Las infecciones son la mayor complicación y causa de muerte en los pacientes de MM, y este riesgo de infección se asocia a la inmunodeficiencia que se genera en el transcurso de la enfermedad, así como por el tratamiento recibido [57].

Manifestación clínica	Causa	Impacto en el paciente
<b>Lesiones óseas</b>	Principal síntoma del MM, presente en el 75% de los pacientes. Las células del mieloma activan los osteoclastos (que destruyen el hueso) y bloquean los osteoblastos (que en condiciones normales son los que reparan el hueso dañado).	Dolor óseo, fracturas, lesión nerviosa o de médula espinal
<b>Anemia</b>	Falta de glóbulos rojos: la proliferación descontrolada de células plasmáticas en médula ósea puede desplazar las células productoras de células sanguíneas normales.	Palidez, debilidad y cansancio
<b>Hipercalemia</b>	Las lesiones óseas de carácter lítico provocan la movilización del calcio óseo.	Letargo, confusión mental, deshidratación, depresión, debilidad, daño renal
<b>Disfunción renal</b>	Aparece insuficiencia renal, frecuentemente desencadenado por la hipercalemia o la infiltración de células mielomatosas al riñón.	Fatiga Confusión mental
<b>Otras</b>	Las lesiones óseas pueden producir compresión de la médula espinal y dolores radiculares.	Dolor de espalda, paraparesias
	Síndromes de hiperviscosidad debido a las altas concentraciones de componente monoclonal en sangre.	Neuropatía, cefalea, trastornos visuales
	Trombocitopenia (bajos recuentos de plaquetas en sangre) provocando trastornos de la coagulación.	Trastornos hemorrágicos: fácil aparición de hematomas, epistaxis o gingivorragias
<b>Función anómala del sistema inmunitario</b>	La leucopenia (carencia de glóbulos blancos normales) puede causar problemas para combatir infecciones  Suele existir una hipogammaglobulinemia en los pacientes con MM por la menor producción y mayor destrucción de los anticuerpos normales, disminuyendo así la defensa frente a agentes patógenos	Susceptibilidad a infecciones

**Tabla 2. Manifestaciones clínicas del MM.**

### 1.6. Diagnóstico

El diagnóstico de MM requiere la presencia de uno o más eventos definitorios de MM además de la evidencia de un 10% o más de células plasmáticas clonales en MO o una biopsia que demuestre la existencia de plasmacitoma (tumor de células plasmáticas). Estos eventos definitorios de MM consisten en la presencia de sintomatología CRAB o al menos uno de estos 3 biomarcadores específicos: CP clonales en MO  $\geq 60\%$ , ratio FLC

en suero  $\geq 100$  y una o más lesiones focales (mayor de 0,5 cm) en la resonancia magnética (RMN) [58].

El diagnóstico diferencial de MM es complejo por la presencia de síntomas comunes a otras enfermedades. Además, suele producirse por un hallazgo casual en un análisis rutinario de sangre. Ante la sospecha, el estudio comienza con la investigación de la historia clínica del paciente y sus antecedentes familiares, junto con una exploración física. Las pruebas de laboratorio recomendadas para el diagnóstico de MM son análisis sistemático de sangre, bioquímica general y estudio de proteínas (electroforesis de proteínas e inmunofijación en suero y orina para poner de manifiesto la presencia de componente monoclonal), seguido de una biopsia/aspirado de médula ósea (inmunofenotipo y citogenética) [33]. Entre los estudios de médula ósea se debe realizar análisis por hibridación in situ con fluorescencia (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*) en todos los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple con el fin de identificar alguna alteración citogenética que pueda ser de valor pronóstico [59]. Se recomienda la realización de tomografía por emisión de positrones (PET) acoplada a escáner de tomografía computarizada (TC), TC de baja dosis de cuerpo completo o RMN de cuerpo completo o de columna y pelvis para detectar las lesiones óseas y tumores de células plasmáticas [60]. Desde 2016, la técnica recomendada para evaluar respuestas completas es la utilización de PET/TC [61]. Esta técnica resulta muy útil en la detección de plasmocitomas solitarios y enfermedad extramedular, así como en la confirmación de la respuesta al tratamiento en pacientes con MM no secretor u oligosecretor [62]. Mientras que la RMN permite evaluar la afectación de partes blandas y lesiones focales.

Un análisis sistemático de sangre podría revelar anemia normocrómica y normocítica (ocurre en el 80% de los casos) [63]. La bioquímica general mostrará los niveles de calcio elevados y función renal alterada. La presencia de proteína monoclonal o pico M en sangre o en orina se pone en evidencia mediante electroforesis de proteínas, normalmente de tipo IgG o IgA, aunque pueden aparecer todos los isotipos de Ig [64]. La proteína monoclonal aparece como una banda homogénea y bien definida en el gel de electroforesis, y como un pico delgado cuantificable en el proteinograma, normalmente las Ig migran a la zona gamma o beta del mismo. Una vez que se ha observado una banda de aspecto monoclonal, se procede a la inmunofijación en suero u orina para determinar el tipo exacto de anticuerpo anormal hallado y permite su confirmación [4].

Las CP se pueden caracterizar por un inmunofenotipo que las distingue de las CP sanas, que consiste en la presencia de anomalías fenotípicas, como ausencia de CD19 o CD45 y expresión de los marcadores aberrantes CD56, CD117, CD81 o CD20, además de la expresión de CD38 y CD138, marcador de linaje de una CP [65]. La expresión de CD117 se asocia a un pronóstico favorable [66], mientras que los CD81<sup>+</sup> presentan peor pronóstico [67], aunque estos datos deben confirmarse en más estudios.

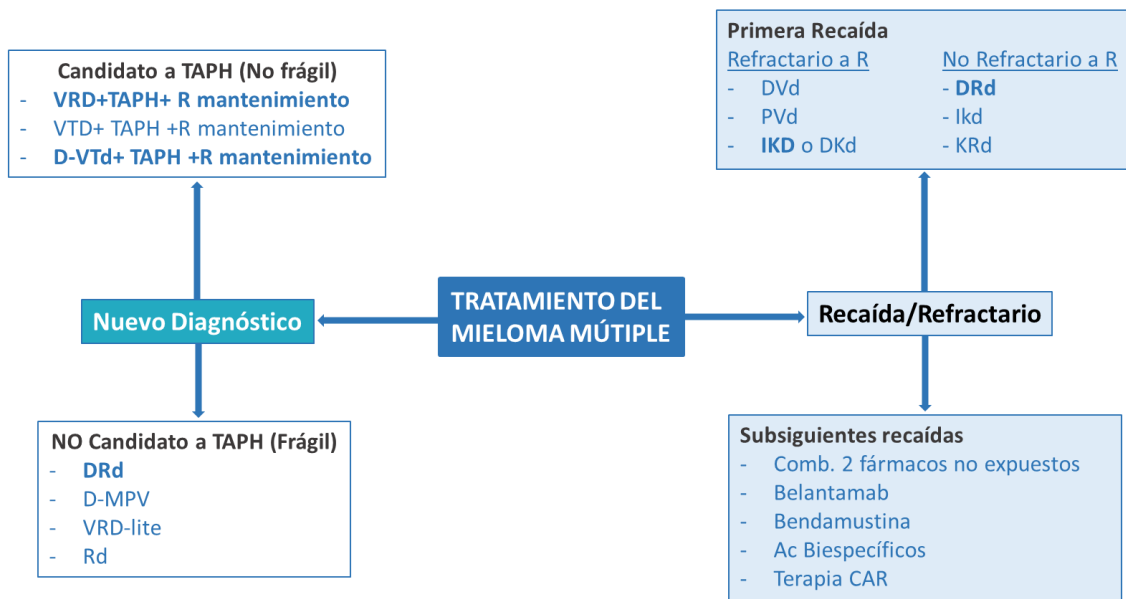
### 1.7. Tratamiento de primera línea

Previo a la utilización de la quimioterapia convencional, el promedio de supervivencia de los pacientes con mieloma era de 7 meses. Hoy en día, la supervivencia media se sitúa en 6 años [48], y el 80% de los pacientes que reciben trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) superan los 4 años de vida, en promedio [24].

El tratamiento estándar de primera línea para los pacientes de MM de nuevo diagnóstico consiste en la administración de tripletes o cuádruplas de tratamiento en los que participa un inhibidor de proteasoma (como bortezomib), un fármaco inmunomodulador (IMiD, como lenalidomida), un anticuerpo monoclonal anti-CD38 y un esteroide (como dexametasona), seguido de un TAPH siempre que sea posible, es decir, los pacientes deben tener una adecuada función orgánica y un buen estatus funcional sin relevantes comorbilidades (paciente no frágil) [68]. Posterior al TAPH, los pacientes deben recibir una terapia de mantenimiento, habitualmente con lenalidomida. Mientras que los pacientes no candidatos a TAPH reciben una combinación de 3 fármacos, que pueden incluir o no un agente alquilante, un IMiD, un anticuerpo anti-CD38 seguido de mantenimiento [68]. Cuando ocurre la primera recaída tras un periodo de remisión superior a 6 meses, el paciente puede recibir el mismo esquema inicial de tratamiento. En caso de que la remisión haya durado menos de seis meses, se suele administrar un esquema terapéutico distinto al inicial [33]. Los esquemas de tratamiento más utilizados se describen en la Fig. 5.

En cuanto a las toxicidades de las terapias de inducción incluyen neuropatía periférica, reactivación de herpes virus, eventos venosos tromboembólicos, neutropenia e infecciones, y teratogenicidad con los IMiDs [68]. Los anticuerpos monoclonales se asocian a reacciones infusionales como disnea, tos, sarpullidos, náuseas o rinitis alérgica [69].





**Figura 5.** Esquemas de tratamiento más utilizados para los pacientes de MM.

R: lenalidomida; V: bortezomib; d: dexametasona; T: talidomida; M: melfalán; D: daratumumab; I: isatuximab; K: carfilzomib.

### Fármacos inmunomoduladores (IMiDs)

Los fármacos inmunomoduladores reciben este nombre porque modifican la respuesta inmune del paciente. El primer IMiD en aprobarse fue la talidomida, en 1998, asociado con una alta toxicidad en personas mayores. A la talidomida le siguió un IMiD de segunda generación, lenalidomida, con menores toxicidades. Lenalidomida se utiliza tanto en primera como segunda línea de tratamiento y como terapia de mantenimiento tras el TAPH. La pomalidomida, IMiD de tercera generación, se usa en MM en recaída en tercera línea de tratamiento o posterior [33]. En desarrollo, se encuentran los IMiD de cuarta generación o CELMoDs: avadomida, iberdomida o mezigdomida [70].

Los IMiDs se conocen por sus propiedades inmunomoduladoras, anti-proliferativas y anti-angiogénicas [71]. La lenalidomida actúa de manera directa e indirecta sobre las células de MM, a través de la activación de las células T o promoviendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en células NK [72, 73]. Por ejemplo, se ha descrito que la lenalidomida incrementa la expresión de TRAIL en la NK [74] y sensibiliza a la célula de MM a la muerte por la célula NK por sobreexpresión de los ligandos MICA y PVR/CD155 [75], ligandos de los receptores activadores NKG2D y DNAM-1, respectivamente, presentes en las células NK. También inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 o IL-6 [76]. Además, todos los IMiDs

tiene un efecto directo sobre cereblon, el sustrato de la ubiquitina E3 ligasa, que degrada los factores de transcripción Ikaros y Aiolos vía proteasoma [77]. En cuanto a la toxicidad de la lenalidomida y como consecuencia de la activación sobre cereblon, se produce un efecto teratogénico. Otros de los efectos adversos frecuentes de los IMiDs son neutropenia (en el 80% de los casos), eventos venosos tromboembólicos (4-5%), toxicidad gastrointestinal (40-50%) o neuropatía (1-15%) [68].

### Inhibidores del proteasoma (IPs)

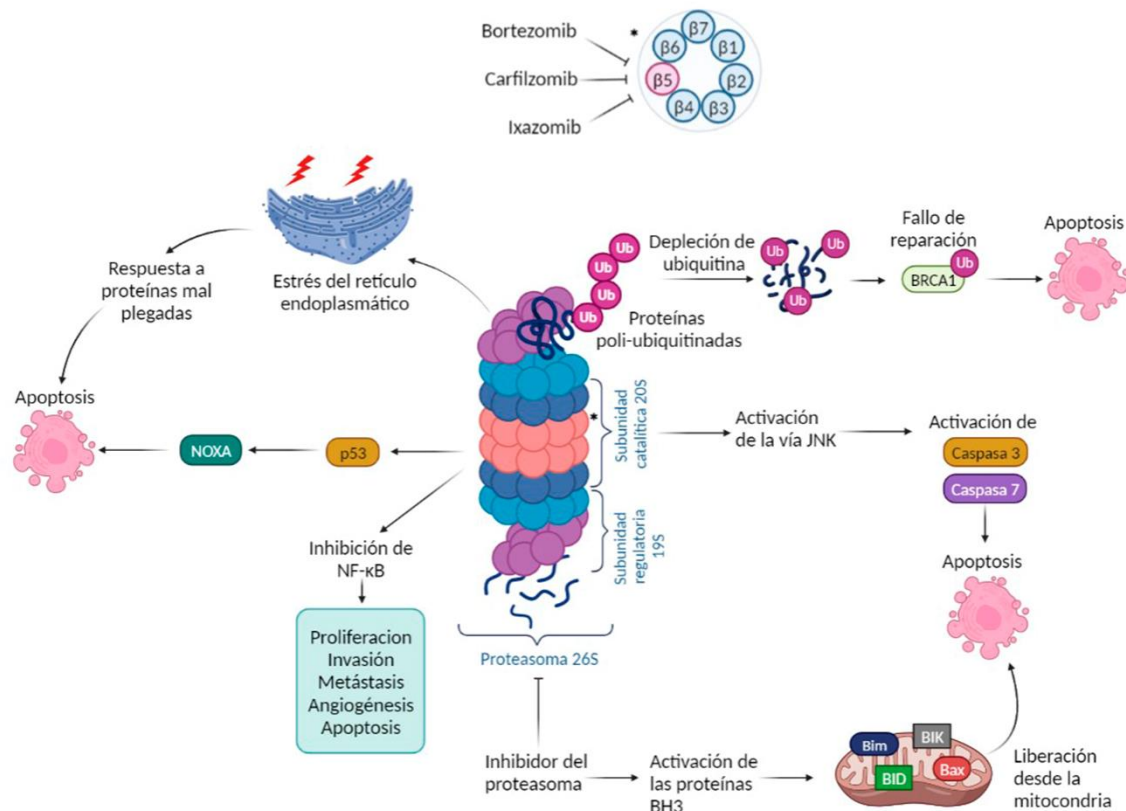
El proteasoma 26S es un complejo enzimático multicatalítico compuesto por al menos 33 subunidades, que puede diferenciarse en dos partes distintas: el complejo regulatorio 19S y el núcleo catalítico 20S. Los genes *PSMA* y *PSMB* codifican las proteínas que constituyen las subunidades del complejo 20S, compuesto por dos anillos alfa externos y dos anillos beta internos. El proteasoma es un orgánulo que se encarga de la maquinaria conservada de la degradación celular y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis proteica. En MM, las células producen una excesiva cantidad de inmunoglobulinas, haciéndolas especialmente dependientes a la función del proteasoma [78]. Los inhibidores del proteosoma (IPs) evitan que este orgánulo en las células elimine proteínas que son esenciales para el control de la división celular, como ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, entre otras [79]. Hasta la fecha, existen tres IPs aprobados por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos): bortezomib, carfilzomib e ixazomib, y hay nuevos IP en desarrollo como oprozomib, delanzomib y marizomib [80]. Bortezomib es el primer inhibidor de su clase de la actividad quimiotripsina. Bortezomib e ixazomib, derivados de ácido borónico e IPs de primera generación, inhiben de manera reversible la subunidad proteolítica 20S del proteasoma 26S, mientras que carfilzomib, tetrapéptido keto-epóxido e IP de segunda generación, lo hace de manera irreversible. La diana de estos IPs es, en todos los casos, la subunidad  $\beta 5$  del proteasoma (26S) [81].

Los mecanismos por los que los IPs conducen a la muerte celular de las células de MM se esquematizan en la Fig. 6. Entre estos mecanismos se encuentra el exceso de proteínas en la célula de MM por la acumulación de Igs, que producen estrés proteotóxico en el retículo endoplasmático (RE) y se activa la respuesta a proteínas mal plegadas, parada del ciclo celular y finalmente apoptosis [82]. Bortezomib induce la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas en el citoplasma, lo que provoca una disminución en la cantidad

nuclear de ubiquitina monomérica, necesaria para poli-ubiquitinar proteínas importantes, como H2AX, que no pueden activarse para reclutar otras proteínas como BRCA1 y RAD51 al sitio de daño en inicio de la reparación del ADN por recombinación homóloga [83]. Además, se produce la inhibición de la ruta NF- $\kappa$ B que afecta a la proliferación, invasión, metástasis, angiogénesis y apoptosis [81, 84]. También se induce directamente apoptosis a través de la quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) y el supresor tumoral p53 [85], activando proteínas pro-apoptóticas como Bim, BID, Bax, BIK y NOXA [86].

Se han descrito efectos inmunomoduladores del bortezomib, como la inducción de apoptosis de las células dendríticas, disminución de moléculas coestimuladoras en las células T y de la producción de citoquinas inflamatorias, así como apoptosis directa sobre linfocitos T e inhibición de NF- $\kappa$ B [87, 88]. Bortezomib ejerce una función immunoeditora de las células NK aumentando su capacidad citotóxica anti-MM porque disminuye la expresión de HLA-I [89] y moléculas HLA-I no clásicas como HLA-E, e incrementando el ligando de TRAIL, DR5 [90] en la superficie de las células mielomatosas. Asimismo, Bortezomib aumenta la expresión de los ligandos de NKG2D y de DNAM-1 en las células de MM [91]. También, incrementa la potencia lítica de la NK aumentando en su superficie proteínas pro-apoptóticas como TRAIL y FasL [92].

Entre los efectos adversos que producen los inhibidores de proteasoma se encuentran la neuropatía periférica (en el 30-40% de los casos), toxicidad gastrointestinal (15-20%) o trombocitopenia (30%), y cardiomiopatías (8-10%) en el caso del carfilzomib [68].



**Figura 6. Mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma.**

Los inhibidores del proteasoma actúan a través de múltiples mecanismos para inducir la muerte celular. \*Bortezomib, carfilzomib e ixazomib inhiben la subunidad  $\beta 5$ , inhibiendo así la actividad catalítica del proteasoma. Imagen adaptada de Nunes, Annunziata. *Semin Oncol.* 2017 Dec; 44(6):377-380 [82].

Se han descrito diversos mecanismos para explicar la resistencia a bortezomib en las células de MM. Por ejemplo, i) alteraciones en el transporte del fármaco, como una alta expresión de extrusores celulares de flujo tipo P-gp, BCRP, LRP o MR1-9; ii) activación de los sistemas de detoxificación de la célula, como niveles altos del ratio GSH/GST; iii) cambios en la configuración de las subunidades diana (actividad XP1 reducida, incrementos en la expresión de ATF4 y autofagia, mutaciones en la subunidad  $\beta 5$  del proteasoma que previenen la unión de BTZ y se concentran en el sitio de unión gen *PSMB5* o mutaciones en *PSMB8*, el gen responsable de codificar la subunidad  $\beta 5$  del inmunoproteasoma; iv) interferencia sobre los factores de control de ciclo celular y la apoptosis, que regulan la supervivencia y apoptosis de la células, por ejemplo, alteraciones en p53, c-Myc, MAF o en el ratio Bax/BCL-2; y v) distorsión de los mecanismos de señalización de numerosas rutas, por ejemplo NF- $\kappa$ B. Bortezomib induce apoptosis inhibiendo la ruta canónica de NF- $\kappa$ B, mientras induce la no canónica, que

hace a la célula menos susceptible a BTZ al mismo tiempo. Otros ejemplos de mecanismos implicados reportados son la activación de la ruta JAK/STAT3 a través de IL-6, vía PI3K/AKT o los mecanismos de resistencia mediados por moléculas de adhesión o factores solubles [93].

### Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH)

Actualmente, el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) es considerado el tratamiento estándar para los pacientes de MM de nuevo diagnóstico no frágiles, normalmente menores de 70 años [94]. En estos pacientes, se emplean factores estimulantes de colonias (normalmente G-CSF) para estimular y movilizar las células madre hematopoyéticas de sangre periférica que pueden ser recolectadas mediante aféresis [95]. Tras la recolección de progenitores, el paciente recibe dosis altas de melfalán, un potente agente alquilante mieloablativo, seguido de la reinfusión de los progenitores [68]. Distintos ensayos han demostrado que recibir un autotrasplante tras el tratamiento de inducción para pacientes candidatos produce un beneficio clínico [96, 97]. Concretamente, el TAPH mejora la media de supervivencia general aproximadamente en 12 meses [98]. En pacientes de MM de alto riesgo se está estudiando si el empleo de trasplante en tándem, un segundo trasplante aproximadamente tres meses tras el primero, podría mejorar la supervivencia de estos pacientes [99]. Hasta la fecha, los resultados obtenidos en distintos ensayos clínicos no resultan concluyentes en cuanto a un posible beneficio en parámetros de supervivencia, por lo que el trasplante en tándem de rutina no se recomienda fuera del contexto experimental del ensayo clínico [33]. Tras el TAPH los pacientes pueden recibir un tratamiento corto de consolidación cuyo beneficio clínico se encuentra en discusión, normalmente con uno o dos fármacos en combinación, seguido de un largo periodo de mantenimiento con lenalidomida o bortezomib, que sí consigue prolongar el tiempo de remisión de la enfermedad [33].

### 1.8. Tratamiento del mieloma múltiple refractario y/o en recaída (MM/RR)

El mieloma múltiple refractario y/o en recaída (MM/RR) se define por los siguientes criterios: enfermedad progresiva, tanto en tratamiento como tras la última respuesta mínima; o enfermedad progresiva tras los siguientes 60 días desde el último tratamiento; ausencia de respuesta mínima durante el tratamiento recibido (enfermedad refractaria

primaria); la presencia de criterios de enfermedad progresiva en ausencia de características de MM/RR; o MM refractario primario [100]. Las opciones terapéuticas para estos pacientes suelen ser regímenes basados en tripletes en los que se combina un IP o un IMiD de segunda o siguiente generación con un anticuerpo monoclonal anti-CD38 [101]. De acuerdo con el estudio retrospectivo MAMMOTH con una cohorte de 275 pacientes, la SG de los pacientes de MM que no son triple refractarios se sitúa en 11,2 meses, la de los triple (resistencia a un IP, un IMiD y un anti-CD38) y cuádruple refractarios (a 1 o 2 IMiDs, 1 o 2 IPs y un anti-CD38) en 9,2 meses, y los penta refractarios (2 IMiDs, 2 IPs y un anti-CD38) 5,6 meses [102]. En estos datos no se refleja todavía el impacto sobre la SG de los tratamientos de terapia avanzada inmunoadoptiva. Existen distintas opciones terapéuticas para estos pacientes. Normalmente, se suelen emplear los anticuerpos monoclonales anti-CD38 daratumumab o isatuximab, o anti-SLAMF7 Elotuzumab, si no se han recibido previamente, en combinación con un IP o un IMiD, y un corticoesteroide. Los principales IPs utilizados en los pacientes MM/RR son bortezomib, carfilzomib e ixazomib; en cuanto a los IMiDs, se emplean lenalidomida o pomalidomida [103-105]. La elección de la combinación depende de distintos factores como el tiempo hasta la progresión, la respuesta a la terapia anterior, la agresividad de la recaída y el estatus funcional del paciente. Para las siguientes recaídas, se están estudiando fármacos con nuevos mecanismos de acción, como venetoclax (ABT-199), un mimético oral de la molécula BH3, inhibidor de la proteína anti-apoptótica BCL2 que se ha demostrado muy eficaz en enfermos que presentan la translocación t(11;14) [106]. Selinexor, aprobado en 2019 para el uso en MM/RR, es un inhibidor selectivo de la exportación nuclear y actúa inhibiendo la exportina-1 presente en el núcleo de las células de mieloma [107]. Como consecuencia de esta inhibición se produce una retención en el núcleo y una activación de supresores de tumores clave tales como p53, BRCA1/2, RB o IκB, y receptores de glucocorticoides, así como la supresión de la traducción de oncoproteínas como c-Myc, ciclina D1 o BCL-2 [108]. Estudios recientes indican que selinexor presenta actividad inmunomoduladora, porque puede reducir la expresión de la molécula de histocompatibilidad no clásica HLA-E en células B malignas y promover la activación de células NK NKG2A<sup>+</sup> [109]. Además, selinexor no reduce el número de células NK y no interfiere en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Se ha publicado recientemente que la sensibilidad a selinexor en pacientes de MM se asocia a la expresión de PVR, ULBP-1, -2 y -3 que son ligandos para receptores activadores de NK [110]. En 2020 fue aprobado por la FDA belantamab mafodotin. Se

trata de un anticuerpo frente a BCMA (antígeno de maduración de células B) que se ha conjugado a la toxina inhibidora de microtúbulos Monometil auristatin F que se une a tubulina e inhibe la polimerización, lo que induce la parada de ciclo celular en la fase G2/M y apoptosis [111]. No obstante, el ensayo fase III con este anticuerpo no ha demostrado diferencias en supervivencia libre de progresión (SLP), por lo que su eficacia a largo plazo se encuentra en discusión [112] y ha sido retirado provisionalmente por la FDA. Otra opción terapéutica disponible en los pacientes con MM/RR es un segundo TAPH, dependiendo del tiempo de respuesta del primer TAPH (>18 meses) [113], con el que se puede alcanzar una SG del 68% a tres años [114]. Sin embargo, se requieren más estudios aleatorizados para definir el beneficio clínico que representa un TAPH de rescate dentro de las estrategias terapéuticas del MM/RR [101].

### 1.9. Inmunosupresión asociada a MM/RR

Existe suficiente evidencia acumulada que indica que la progresión del mieloma está asociada a la pérdida del control del sistema inmune sobre el tumor [115]. El sistema inmune en el contexto de MM/RR se encuentra inmunosuprimido. En el 75% de los pacientes se produce inmunoparesia debido al predominio del componente monoclonal, por la que se reduce la capacidad de secretar Ig policlonales [54], y una disfunción de las células NK y T [116, 117]. Los pacientes triple refractarios presentan clones de CP altamente proliferativos, con una expresión disminuida de rutas clave para la inmunovigilancia, como las del IFN y TNF, y se vuelven independientes de la señalización por IL-6 y TGF- $\beta$  [118].

Ocurren distintos mecanismos por los que las células de MM escapan a la vigilancia del sistema inmune (Fig. 7). Aunque en algunos tumores hematológicos como MM la expresión de moléculas HLA-I en estadios avanzados es elevada [119], se produce un defecto en el procesamiento y presentación de antígenos, modificando el repertorio de péptidos y reduciendo la capacidad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> [120]. En cuanto al receptor activador DNAM-1, se ha reportado su reducción en las células NK de pacientes con mieloma activo en comparación con individuos sanos o pacientes en remisión, lo que disminuye su actividad [121]. Se ha reportado que, en fases iniciales de la enfermedad, las células de MM expresan en altos niveles ligandos de NKG2D, como MICA, pero a medida que progresa la enfermedad, este ligando disminuye su expresión en membrana en las células mielomatosas [119, 122].

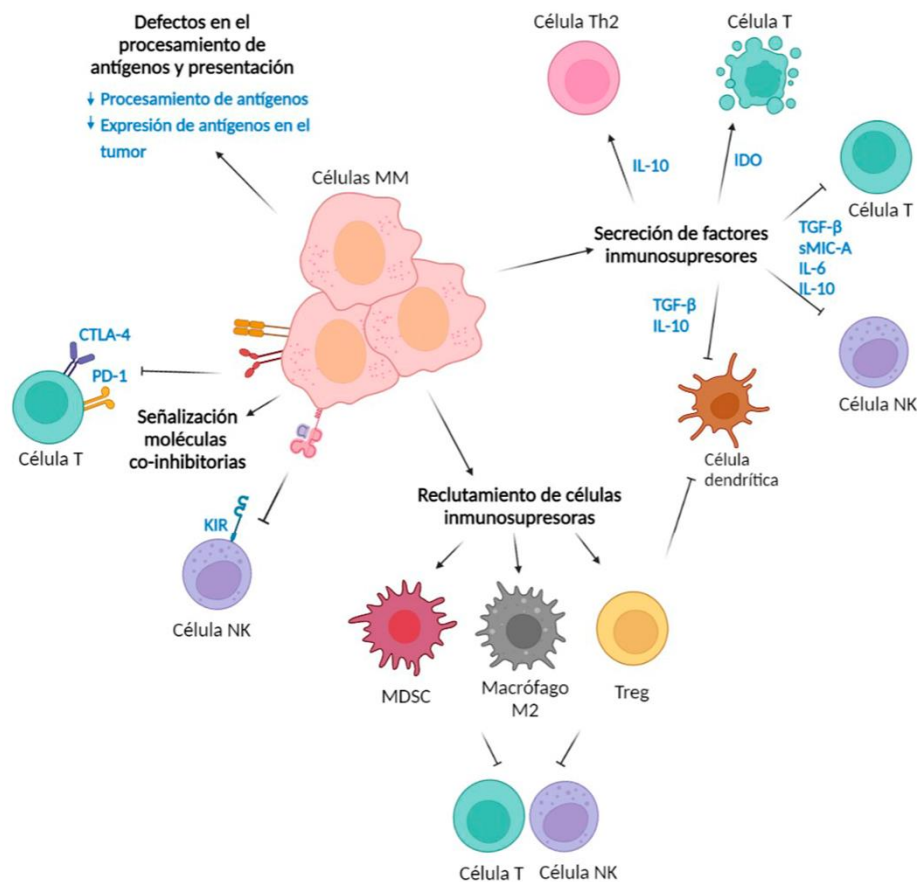
Por otra parte, la sobreexpresión de HLA-I induce una inhibición de las células NK mediada por KIR. La actividad de las células T en MM se ve impactada por el reconocimiento de puntos de control inhibitorios. Por ejemplo, el receptor inhibitorio antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) está implicado en la activación temprana de las células T [123] y la expresión de esta y otras moléculas inhibitorias, como PD-1, aumenta durante su activación [124]. También se ha descrito un aumento de la expresión de PD-1 en las células T de pacientes con MM en comparación con sujetos sanos [125]. Las células de MM presentan una alta expresión de ligandos de estos puntos de control, como PD-L1, que cuando interactúan inmunoevidan la célula T, lo que conlleva el agotamiento de su actividad y contribuye a la inmunorresistencia.

Entre los mecanismos de evasión del sistema inmune, existe un microambiente inmunosupresor en el que se producen altos niveles de factores inmunes inhibitorios como MIC A soluble (sMICA), interleuquinas (como IL-6 o IL-10), TGF- $\beta$  e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en el suero de los pacientes de MM [126, 127]. Por ejemplo, la IL-6 liberada por el tumor deteriora la capacidad citotóxica de las células NK y estimula la producción de IL-10, lo que a su vez suprime la función de las células dendríticas e inhibe la producción de INF- $\gamma$  por las células NK [128]. TGF- $\beta$  disminuye tanto la expresión de NCRs y NKG2D, receptores activadores de la NK, como la expresión de moléculas coestimuladoras de células T en la superficie de las células dendríticas, reduciendo su capacidad de presentación de antígenos [129]. En el mismo escenario, la enzima IDO causa la parada del ciclo celular y apoptosis de las células T efectoras por depleción de triptófano en el microambiente tumoral [130] que, a su vez, produce kinurenina, un compuesto tóxico para las células T y NK. Además, la adenosina liberada tras reacciones catalíticas iniciadas, entre otras, por la molécula de superficie CD38 en la célula de MM, inhibe la actividad de los linfocitos T [131].

Se ha caracterizado previamente un reclutamiento de células inmunosupresoras en la MO [132]. En este sentido, la IDO, la IL-10 y el TGF- $\beta$  reclutan a las células T reguladoras (Tregs), células supresoras derivadas mieloides (MDSCs), macrófagos tipo M2, B reguladoras, plaquetas, células mesenquimales y fibroblastos asociados a cáncer [133], que favorecen la anergia de las células efectoras [124]. En conjunto, las células supresoras inmunes presentes en el microambiente tumoral promueven la proliferación del tumor mientras reducen la función T o NK endógenas a través del contacto directo célula-célula



o liberando factores solubles. El estado de inmunosupresión persistente en MM justifica la necesidad de una terapia adoptiva con células NK o T potenciadas ex vivo.



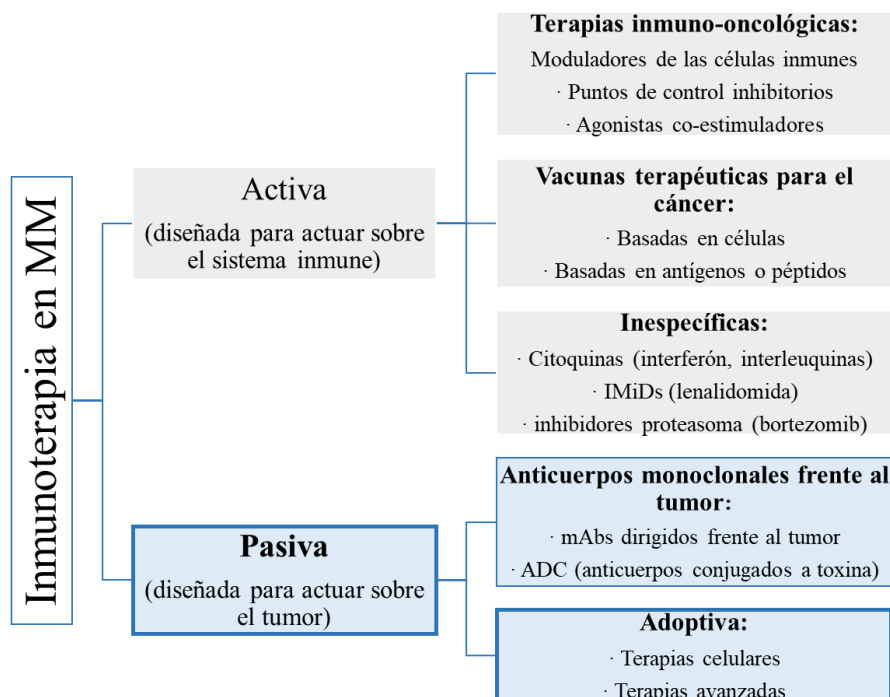
**Figura 7. Inmunosupresión en el mieloma múltiple.**

El mieloma múltiple puede inhibir al sistema inmune a través de mecanismos como presentación antigénica deteriorada, señalización a través de moléculas co-inhibitorias, secreción de factores inmunosupresores y reclutamiento de células inmunosupresoras. IDO: indoleamina 2,3-dioxigenasa; TGF-beta: factor de crecimiento transformante beta; s-MICA: MICA soluble; IL: interleuquina; CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; PD-1: programmed death-1; MDSC: célula supresora derivada mieloide; Treg: célula T reguladora. Modificada de Roeven, Hobo, Schaap, Dolstra. Hum Vaccin Immunother. 2014;10(4):896-910.

## 2. INMUNOTERAPIA EN MIELOMA MÚLTIPLE

La inmunoterapia activa es la diseñada para actuar frente al sistema inmune del paciente. En mieloma múltiple existen distintas estrategias inmunoterapéuticas para activar el sistema inmune contra el tumor (Fig. 8), como son las terapias immuno-oncológicas basadas en el bloqueo de los puntos de control inhibitorios, como los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD1 [134], o agonistas coestimuladores, como el anticuerpo monoclonal anti-CD137 (41BB) para potenciar a las células inmunes [135]. Dentro de la

inmunoterapia activa se engloban también fármacos anti-MM que son capaces de generar una respuesta inespecífica en las células del sistema inmune para favorecer su acción anti-tumoral, como son el inmunomodulador lenalidomida o el inhibidor de proteasoma bortezomib [136, 137], así como citoquinas diseñadas por ingeniería genética, como los superagonistas de IL-15 (NKTR255 o ALT-803) [138, 139] (NCT02099539). En la inmunoterapia activa también se emplean vacunas terapéuticas para estimular el sistema inmune frente al tumor, como las basadas en factores estimulantes de colonias como GM-CSF, que reclutan células dendríticas u otras células presentadoras de antígenos [140] o vacunas basadas en la infusión directa de péptidos [141] o nanopartículas que producen una respuesta frente a MM [142]. La inmunoterapia pasiva hace referencia a la transferencia de anticuerpos o terapias celulares dirigidas directamente contra el tumor. En MM, los anticuerpos monoclonales aprobados son elotuzumab o daratumumab [143, 144] y entre los anticuerpos conjugados a toxinas más relevantes se encuentra belantamab mafodotin [145]. Además, se está estudiando la inmunoterapia adoptiva, por ejemplo, el uso de linfocitos infiltrantes de médula [146], células dendríticas o células NK (NCT02481934), o células T o NK redirigidas con un receptor quimérico de antígeno (CAR) [147] frente a antígenos tumorales, como se describe posteriormente.



**Figura 8. La inmunoterapia en MM.**

Inmunoterapia activa y pasiva en el tratamiento de MM. IMiDs, fármacos inmunomoduladores; mAbs, anticuerpos monoclonales.

## 2.1. Inmunoterapia pasiva

### 2.1.1. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales representan una estrategia alternativa anti-neoplásica dirigida ya que pueden ser diseñados para atacar a una determinada molécula en la superficie de las células de mieloma. El primer anticuerpo monoclonal sin conjugar autorizado para el tratamiento de mieloma múltiple fue daratumumab [148], que se une a la ectoenzima de membrana CD38 presente en las células de mieloma en altas cantidades, mientras que se expresa en bajos niveles en las células mieloides y linfoides normales [149]. El daratumumab exhibe distintos modos de actuación. La unión de daratumumab al CD38 de las células de mieloma induce apoptosis directa, además, puede mediar la muerte de las células de mieloma por citotoxicidad mediada por complemento, ADCC [150] y fagocitosis mediada por anticuerpo [151]. Daratumumab también modula el ambiente inmunosupresor que se genera en la médula ósea, favoreciendo la reducción de moléculas inmunosupresoras como la adenosina e inhibiendo la actividad enzimática CD38 en las células plasmáticas de mieloma [143]. El daratumumab también actúa frente a las células inmunosupresoras, como las Treg y las células MDSCs, que son CD38<sup>+</sup> [143]. Tras 3 años de seguimiento, el estudio en fase 3 CASTOR para pacientes con MM/RR ha demostrado un beneficio clínico del empleo de daratumumab en combinación con bortezomib y dexametasona frente al tratamiento en ausencia de daratumumab (SLP de 16,7 meses frente a 7,1 meses) [148]. Entre los efectos adversos más comunes de grado 3-4 asociados a esta terapia se encuentran toxicidades hematológicas como trombocitopenia, anemia, neutropenia y linfopenia, y otros no hematológicos como neuropatía sensorial periférica [152]. Otro anticuerpo anti-CD38 aprobado para el tratamiento de MM/RR es isatuximab, y existen otros en desarrollo avanzado, como MOR202 y TAK-079.

Elotuzumab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de MM/RR. Se une a la proteína SLAMF7 (también conocido como CS1), que es un miembro de la superfamilia de los receptores de inmunoglobulinas presente en las células del mieloma, aunque también en células NK [153]. Elotuzumab potencia al sistema inmunológico en el ataque directo sobre las células, es decir, elotuzumab no induce directamente la muerte del tumor si no que promueve la activación de las células NK a través de ADCC. Además, se ha publicado que la combinación de elotuzumab con

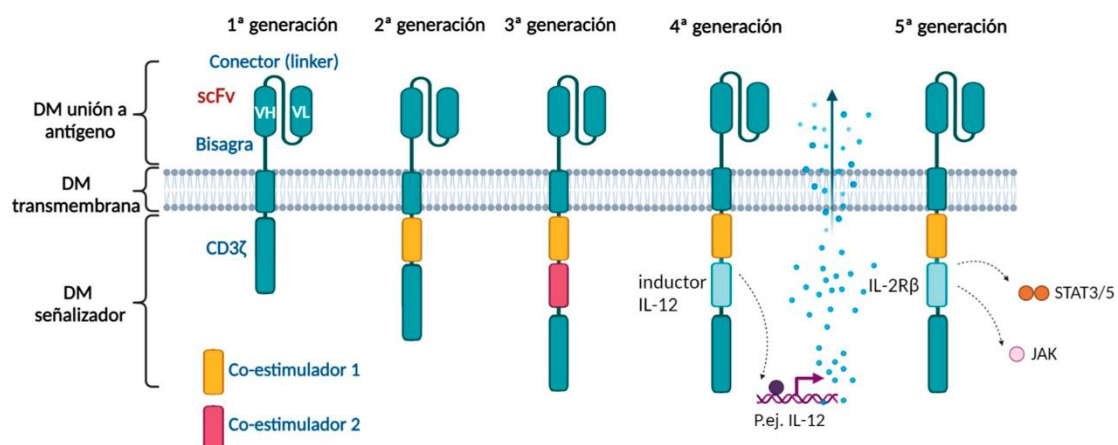
bortezomib aumenta significativamente la eficacia terapéutica *in vivo* en modelos de ratón [154]. Tras 3 años de seguimiento, el ensayo clínico en fase 3 ELOQUENT-2 demostró una mejora de la SLP empleando elotuzumab en combinación con lenalidomida y dexametasona, en comparación con el tratamiento en ausencia de elotuzumab (31,4 meses frente a 29,5 meses) (NCT01239797). Entre los efectos adversos asociados a este tratamiento se encuentran toxicidades hematológicas principalmente, como linfocitopenia o neutropenia [155].

### 2.1.2. Anticuerpos biespecíficos de células T (BiTE)

A diferencia de la terapia personalizada T-CAR que requiere la extracción de las células T del paciente para su modificación y posterior infusión, a la que se hará referencia a continuación, los anticuerpos biespecíficos son una terapia universal con menores efectos adversos. Los anticuerpos biespecíficos de células T (BiTE) en su forma más básica consisten en una proteína de fusión que contiene las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de las Igs (scFv) de dos anticuerpos monoclonales unidos, una dirigida frente a CD3 presente en la superficie de las células T y la otra dirigida frente a un antígeno asociado al tumor [156]. Estas moléculas BiTE se unen y activan las células T redirigiéndolas contra las células tumorales, independientemente de una presentación antigénica en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [157]. Teclistamab reconoce CD3 y BCMA expresado en las células de MM. En cuanto a su eficacia, el ensayo clínico MajesTEC-1 en fase 2 (NCT04557098) ha mostrado una tasa de respuesta global del 70% en los pacientes de MM/RR. Los efectos adversos más comunes fueron síndrome de liberación de citoquinas, neutropenia, anemia, trombocitopenia e infecciones frecuentes, así como neurotoxicidad de grado 1-2 [158]. Otro BiTE aprobado para el tratamiento de MM/RR es talquetamab, un BiTE que se une a GPRCD5D y CD3, redirigiendo a las células T para atacar a las células de mieloma. GPRCD5D presenta una alta expresión en las células plasmáticas patológicas, mientras que su expresión es limitada en los tejidos normales [159]. El ensayo clínico en fase 2 MonumentAL-1 (NCT03399799) ha mostrado una tasa de respuesta global del 71%. Y en cuanto a los efectos adversos, se han reportado síndrome de liberación de citoquinas, neutropenia y disgeusia, así como reacciones cutáneas [160]. Otros BiTE en desarrollo son elranatamab o linvoseltamab, dirigidos frente a BCMA. En la Tabla 3 se muestran las tasas de eficacia y los principales eventos adversos de los más relevantes.

### 2.1.3. Inmunoterapia adoptiva CAR

La terapia adoptiva utilizando receptores quiméricos de antígenos (CAR) ha revolucionado el tratamiento de los tumores hematológicos. La terapia T-CAR consiste en la extracción y expansión in vivo de células T desde sangre periférica y modificadas genéticamente frente a una proteína de superficie de las células de mieloma. Las células T-CAR modificadas son de nuevo infundidas al paciente para eliminar específicamente la célula tumoral, tras una linfodepleción del paciente para evitar que su sistema inmune pueda rechazarlas [68]. Un CAR consta de un fragmento variable de cadena simple (scFv) de un anticuerpo monoclonal o el ectodominio de un receptor natural, que constituye el dominio de unión al antígeno específico para el que ha sido diseñado [161]; esta región se ancla a un dominio transmembrana a través de un elemento bisagra o espaciador, y este, a su vez, va unido a un dominio intracelular compuesto por un dominio señalizador CD3 $\zeta$  y, en función de si contiene uno o varios dominios coestimuladores, se clasifican en 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup> generación [161-163] (Fig. 9). Existen también los denominados CAR de 4<sup>a</sup> generación o “CAR armados”, que además son capaces de producir de forma autocrina citoquinas que modifican el microambiente tumoral, incorporando a la estructura del CAR el transgén deseado [164]. Recientemente, se han incluido los CAR de 5<sup>a</sup> generación, que incorporan el dominio señalizador del receptor de una interleuquina, el más común incorpora el receptor de la IL-2, que permite la activación de la ruta JAK/STAT [165]. Entre los principales dominios coestimuladores se encuentra 4-1BB, CD27, CD28, OX40, ICOS y CD40, entre otros.



**Figura 9. Estructura y clasificación de una molécula CAR.**

DM: dominio. Adaptada de Rafei, Daher, Rezvani. Br J Haematol. 2021 Apr; 193(2):216-230. [166]

#### 2.1.4. Dianas clave en la inmunoterapia del MM

##### BCMA

El antígeno de maduración de células B es una glicoproteína transmembrana de tipo III que pertenece a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF17) y presenta un perfil de expresión limitado a plasmablastos y células plasmáticas sanas y patológicas. Hallazgos recientes también sugieren que BCMA puede expresarse en células del ganglio basal, dando lugar al síndrome Parkinsoniano [167]. BCMA desempeña un papel importante en la proliferación y en la supervivencia de las células B [168]. Los ligandos de BCMA son: el factor de activación de células B (BAFF) necesario para la homeostasis y el desarrollo de las células B, y APRIL (por sus siglas en inglés “a proliferation-inducing ligand”), que induce la activación de células B y su proliferación [169]. BAFF se expresa principalmente en monocitos y células dendríticas [170], mientras que APRIL ha sido identificado en monocitos [169] y células tumorales como en linfoma o carcinoma de colon [171]. Se han encontrado niveles incrementados de BAFF y APRIL en la circulación de pacientes de MM [172, 173]. Entre las rutas de señalización implicadas que median estas funciones tras la interacción de BAFF o APRIL con BCMA están NF- $\kappa$ B, JNK, ERK o MAPK, importantes para el crecimiento y supervivencia de las células plasmáticas [174].

Se ha demostrado que los niveles de BCMA soluble (sBCMA) aumentan en el suero de los pacientes de MM a medida que progresa la enfermedad [175]. Las  $\gamma$ -secretasas son complejos de proteasas de múltiples subunidades que escinden las proteínas transmembrana de un solo paso, dentro del dominio transmembrana. Entre sus sustratos se encuentra la molécula BCMA [176], que es liberada al citoplasma en su forma soluble. De esta forma, el sBCMA compite con el BCMA en membrana por la unión a BAFF y APRIL [177], y con el CAR de BCMA a modo de señuelo [178]. Este fenómeno de evasión tumoral podría comprometer la eficacia de las terapias anti-BCMA, aunque estos efectos pueden mitigarse con el empleo de inhibidores de  $\gamma$ -secretasas [175] en monoterapia o en combinación con el ácido trans-retinoico [179].

##### Ligandos del receptor NKG2D (NKG2D-L)

NKG2D es uno de los principales receptores activadores de las células NK, aunque también se expresa en células NKT y linfocitos T citotóxicos, principalmente células T  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> [180]. También se ha detectado en algunas subpoblaciones CD4<sup>+</sup> bajo

condiciones patológicas como enfermedad de Crohn [181] o tras una infección viral por citomegalovirus [182]. El receptor consiste en un homodímero proteico de tipo II que pertenecen a la superfamilia de lectinas de tipo C. La señalización de este receptor se desencadena tras la formación de un hexámero con el adaptador DAP10, que contiene dominios YxxM, que se fosforilan en el citoplasma y producen la unión de la subunidad p85 de la quinasa PI3K y las moléculas Grb2 y Vav1 [183]. Los ligandos de NKG2D (NKG2D-L) están compuestos por 8 proteínas distintas: MICA, MHC clase I relacionado con polipéptido A, MICB y 6 proteínas de unión a la proteína UL16 (ULBPs) 1-6 (ULBP1-6) [184]. Se conoce que al menos uno de estos ligandos se expresa en más del 85% de los tumores hematológicos, incluido MM [119, 185]. Mientras que la expresión constitutiva de NKG2D-L en tejido sano está restringida a epitelio gastrointestinal [186], su expresión se induce en células dañadas o bajo condiciones de estrés como choque térmico [186] o estrés oxidativo [187], así como en células infectadas por virus [188, 189] o situaciones de hiperproliferación [190].

La expresión de los ligandos de NKG2D está regulada de forma transcripcional y postranscripcional. Existen represores y activadores transcripcionales de estos ligandos. La inducción de la expresión de NKG2D-L se asocia a los reguladores de las rutas de respuesta a daño en el ADN, entre los que se encuentran ATR y ATM, así como sus sustratos fosforilados Chk1 y Chk2, y el supresor tumoral p53 [191]. Otro activador directo de los NKG2D-L implicado en el ciclo celular es el factor E2 (E2F). Por otra parte, la señalización por TGF- $\beta$  [192] así como la activación de la ruta JAK/STAT [193] reprimen la expresión de NKG2D-L. Por ejemplo, se conoce que las histonas deacetilasas (HDAC) 3 [194] y 8 [195], la quinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3) [196] y el factor de transcripción IRF4 [75] son capaces de reprimir la expresión de los ligandos de NKG2D. Otro regulador negativo de la expresión de NKG2D-L es la hipoxia, que promueve la liberación de exosomas y el corte de estos ligandos al medio soluble que pueden actuar como señuelos [197] a través de la disrupción de la señalización del óxido nítrico [198]. Por otro lado, las proteasas MMP (metaloproteinasas de la matriz) y las metaloproteinasas ADAM (por sus siglas en inglés *a disintegrin and a metalloproteinase*), fundamentalmente ADAM 9, 10 y 17 [199], se encargan del corte de NKG2D-L en membrana, provocando el aumento de los ligandos en su forma soluble. Se ha demostrado que los niveles de MICA soluble (sMICA) son un factor pronóstico en MM [200] bloqueando el receptor y disminuyendo la expresión del receptor NKG2D [201], lo que

contribuye a la inmunoevasión tumoral. No obstante, se ha demostrado que altos niveles de sMICA no afectan a la actividad citotóxica de las células T NKG2D-CAR [202].

#### CD138 (Syndecan-1)

CD138 es una glicoproteína transmembrana de tipo I que pertenece a la familia sindecano-proteoglicano. Entre sus funciones se encuentra la señalización celular, adhesión célula-célula, organización del citoesqueleto y tumorigénesis [203]. Se expresa principalmente en células epiteliales, aunque también en células linfoides (pre-B) y células mesenquimales en el estroma de la MO. Las células de MM presentan una alta expresión de CD138, su marcador de linaje. CD138 soluble es un factor de mal pronóstico en MM [204]. CD138 reconoce numerosas moléculas de adhesión extracelular, integrinas [205], factores de crecimiento [206], citoquinas [207] y quimiocinas [208]. Además, CD138 se une al factor de supervivencia APRIL y al receptor TACI (del inglés *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*) en las células de MM [209]. En MM se le ha atribuido una toxicidad por expresión de la diana fuera del tumor, ya que CD138 se expresa también en distintos tejidos sanos como células epiteliales, tracto gastrointestinal, hepatocitos o vejiga [210].

#### CD38 (ADP-ribosa ciclasa 1)

CD38 es una glicoproteína de tipo II de la familia de las ADP-ribosa ciclasa que juega un papel regulador en la homeostasis del calcio, la señalización nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y adhesión [211]. Se expresa en mayor medida en células hemotopoyéticas y células mieloides, aunque en menor medida se puede encontrar en casi todos los tipos de tejidos [212]. De manera uniforme, se expresa en altos niveles en las células plasmáticas de MM. Por ello, frecuentemente se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD38, como daratumumab [213]. El ligando conocido de CD38 es la molécula de superficie de células endoteliales CD31 [214]. Se ha reportado toxicidad asociada a fratricidio debido a la expresión de CD38 predominantemente en las células NK, pero también en células B, macrófagos, células dendríticas, células T, células linfoides innatas, neutrófilos y monocitos [215].

#### GPRC5D (G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member D)

GPRC5D es un receptor transmembrana huérfano que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, cuya función y ligandos no se conocen con exactitud, aunque se le ha atribuido un papel importante en la proliferación tumoral en MM [216]. Las células



de MM expresan GPRC5D en altos niveles, y las células plasmáticas sanas o células B muestran una menor expresión de este receptor [159]. Las células del folículo piloso [217] y las células de la placa ungueal expresan GPRC5D [218], pero un estudio en monos ha demostrado ausencia de alopecia mediada tras el tratamiento con células T GPRC5D CAR [219].

### CD19

CD19 es una glicoproteína transmembrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD19 juega un papel en la respuesta inmune, modulando la señalización del receptor de células B (BCR), que se expresa en células B durante todo el proceso de maduración hasta la diferenciación terminal en células plasmáticas, donde desaparece [220]. La microscopía de alta resolución dSTORM ha mostrado una baja expresión de CD19 en las células clonotípicas de MM, que se caracterizan por una alta tasa proliferativa y resistencia a tratamientos [221]. Esta expresión no es detectable por citometría de flujo en una alta proporción de pacientes [222], lo que justificaría que algunos pacientes de MM/RR respondan a terapias T-CAR anti-CD19 en combinación con otros tratamientos [221].

### SLAMF7 (CS1)

SLAMF7, también denominado CS1, es un receptor glicoproteína de membrana de la familia de la molécula activadora señalizadora de linfocitos (SLAM) involucrado en función inmune y mediación de la inmunidad [223]. SLAMF7 actúa como ligando y receptor, es decir, reconoce como ligando otra molécula de SLAMF7 [224] y presenta una alta expresión en células plasmáticas normales y patológicas de MM [225]. No obstante, también se expresa en tejido sano, predominantemente en células NK y en células T CD8<sup>+</sup> [226], por lo que induce fratricidio de las poblaciones inmunes efectoras.

### FcRL5 (CD307)

El receptor Fc receptor-like 5 (FcRL5 o IRTA2) pertenece a la familia de los receptores Fc. Se expresa solo en el linaje B, sobre todo en células B de memoria y células plasmáticas [227]. FcRL5 pertenece a una familia de 6 genes identificados recientemente de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los ligandos de FcRL5 no se conocen, pero la señalización por FcRL5 se ha asociado a una proliferación aumentada y a la expresión isotípica durante el desarrollo de las células B primadas por antígeno. Las toxicidades

predecibles de las terapias dirigidas contra este receptor son coincidentes con los tejidos fuera del MM donde se expresa, como son la piel y el tracto gastrointestinal [228].

#### CD44 variante 6 (CD44v6)

CD44, un miembro de la familia de las glicoproteínas transmembrana implicadas en adhesión celular, promueve la migración celular y la supervivencia tumoral [229]. CD44 presenta una gran heterogeneidad debido al corte alternativo de al menos 10 de los 20 exones que presenta el gen CD44, lo que da lugar a las distintas variantes con dominios extracelulares variables [230]. Entre las variantes de CD44 se encuentra CD44v6, que contiene el dominio 6 de los exones [231]. CD44v6 se expresa en diversos tipos tumorales, principalmente adenocarcinomas escamosos pero también en MM de alto riesgo y LMA [232], mientras que en tejido sano su expresión se restringe a algunas subpoblaciones de células del epitelio, como los queratinocitos [233]. CD44v6 es el receptor de ácido hialurónico [234] y otros ligandos como osteopontina [235], el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) [236], colágeno, metaloproteinasas de la matriz [237] y selectina-E [238]. La expresión de la diana fuera del tumor hizo que se detuviera el desarrollo con el anticuerpo anti-CD44v6 bivatuzumab por toxicidad sobre piel y mucosa, pero esa toxicidad no se ha observado cuando la scFv del anticuerpo se incorpora a las células T-CAR [239]. CD44v6 se expresa también en células del sistema monocito-macrofágico [240] y produce una toxicidad reversible que puede estar relacionada con una disminución del grado de la tormenta de citoquinas (CRS) que se produce cuando se utiliza este CAR [241].

Además de las citadas dianas terapéuticas, otras se encuentran en estudio para MM, como integrina  $\beta 7$  [242] y CD229 [243].

#### 2.1.5. Inmunoterapia T-CAR en MM

La inmunoterapia T-CAR es una terapia innovadora que ha mostrado eficacia sin precedentes en enfermedades oncohematológicas como la leucemia linfoblástica tipo B y linfomas CD19<sup>+</sup> [244, 245], en pacientes en línea avanzada de tratamiento. Paralelamente, los resultados en los ensayos pivotaes han resultado en la aprobación de dos productos T-CAR BCMA para pacientes con MM/RR en cuarta línea de tratamiento. Idecabtagene vicleucel (ide-cel) fue el primero en aprobarse mediante el ensayo pivotal fase I/II KarMMa1 (NCT03361748). En una cohorte de 128 pacientes, el ratio de respuesta global

se situó en el 73% con una SLP de 8,8 meses [246]. El 84% de los pacientes desarrollaron tormenta de citoquinas, o CRS por sus siglas en inglés, un 18% reportó complicaciones neurológicas y las citopenias fueron frecuentes [247]. En cuanto a ciltacabtagene autoleucel (cilta-cel), dentro del ensayo CARTITUDE-1 (NCT03548207), se estudió una cohorte de 97 pacientes cuyo ratio de respuesta global se situó en el 97,9%, con una SLP del 60,5% a 2 años [246]. Respecto a la toxicidad, el 95% de los pacientes desarrollaron CRS, el 21% desarrolló neurotoxicidad y las citopenias fueron también frecuentes [247].

En la actualidad hay registrados alrededor de 130 ensayos clínicos T-CAR en MM. La mayoría (alrededor de 80) de ensayos están redirigidos hacia BCMA, aunque se están desarrollando otros productos T-CAR dirigidos frente a SLAMF7 (NCT03958656) [248], CD38 (NCT03464916) [249], GPRC5D (NCT04555551) [250], CD44v6 (NCT04097301) [251], CD19 (NCT02135406) o NKG2D (NCT02203825), entre otros. En relación con el CAR NKG2D, esta molécula quimérica ha demostrado tener efecto anti-MM además de actividad antiangiogénica frente a la neovasculatura del tumor, además de su papel inmunomodulador del microambiente tumoral al dirigirse frente a células inmunosupresoras MDSCs y Treg, y reclutar células mieloides y macrófagos [252]. En un ensayo fase I con células T-CAR NKG2D frente a MM/RR (NCT02203825) no se objetivó ninguna respuesta salvo una mejora transitoria en los parámetros hematológicos y no se produjeron CRS ni neurotoxicidades. La expansión y persistencia de las células T-CAR fue muy limitada dentro del paciente, lo que podría justificar la falta de eficacia [253]. En la tabla 3 se comparan las principales terapias aprobadas por la FDA para el tratamiento de pacientes de MM triple-refractarios.

A diferencia de lo que ocurre en los ensayos con T-CAR anti-CD19, las curvas de supervivencia en los ensayos T-CAR BCMA no alcanzan *plateaus* [247]. La falta de estabilidad en la respuesta puede deberse a mecanismos de resistencia intrínsecos al tumor, como la aparición de clones negativos o células con baja expresión del antígeno diana [254, 255] o que afectan al efector T, por ejemplo los mecanismos de agotamiento mediados por los puntos de control inhibitorios [256]. Una solución para vulnerar estos mecanismos de resistencia consistiría en el uso de otros efectores inmunes cuya eficacia no depende solamente del receptor quimérico o la utilización de células T-CAR duales. Entre las combinaciones de T-CAR duales para el tratamiento de MM/RR para sobrepasar la recaída por pérdida de la diana CAR se encuentran la combinación de los CAR

BCMA/GPRC5D [257], BCMA/CD38 [258] (ChiCTR1800018143) y BCMA/CD19 [259] (NCT04236011).

Una vez que los pacientes progresan tras recibir un tratamiento con células T-CAR anti-BCMA tienen pocas opciones terapéuticas disponibles y los estudios donde se analiza su pronóstico en este contexto son escasos. Un estudio reciente recoge la evolución de 20 pacientes que recayeron tras la terapia T-CAR anti-BCMA y recibieron tratamientos de rescate con anticuerpos anti-CD38, IMiDs, regímenes triples o cuádruples de combinaciones de fármacos, auto o alotrasplante o más rondas de terapia T-CAR [260]. La media de SG y SLP de estos pacientes tras recaer a la terapia T-CAR anti-BCMA fue de 11,9 y 4,5 meses, respectivamente. De los pacientes que recibieron una segunda terapia T-CAR anti-BCMA tras recaer a la primera, la SLP aumentó a 14,3 meses, y la SG no ha sido todavía alcanzada. Los pacientes que recibieron una terapia T-CAR dual CD19-BCMA alcanzaron una SG y SLP inferiores, de 8,1 y 1,1 meses, respectivamente. En otro estudio retrospectivo basado en las respuestas de 79 pacientes que recayeron tras recibir una terapia T-CAR anti-BCMA [261], los pacientes alcanzaron de media una SG de 17,9 meses. Estos pacientes recibieron tras recaer un tratamiento de rescate o una terapia basada en células T. El ratio de respuesta global del primer grupo fue 43,4%, con una SLP de 3,5 meses. El 44,3% restante de los pacientes recibieron una terapia basada en células T (BiTE o una subsiguiente terapia T-CAR), todavía no ha alcanzado la SG después de 21,3 meses de seguimiento, y la SLP superó los 9 meses. Estos estudios sugieren que una segunda inmunoterapia, ya sea otra terapia T-CAR o BiTE, después de la recaída a la terapia T-CAR contribuye de manera significativa a la supervivencia, independientemente de que sean dirigidas de nuevo frente a BCMA u otras dianas [261]. Este escenario puede justificar el uso de nuevas inmunoterapias de forma secuencial, como la terapia con células NK-CAR.

TTO	Fase	Pacientes	Ratio de RG	Duración media de respuesta	Mediana SLP	Mediana SG	CRS	Neurotoxicidad	Muerte asociada a recaída
		n°	n° (%)	meses	meses	meses	% (≥grado 3)		n° (%)
<b>Terapias aprobadas por la FDA</b>									
Selinexor	2	122	32 (26)	4,4	3,7	8,6	NA	NA	12 (10)
Belantamab mafodotin	2	97	31 (32)	11	2,8	13,7	NA	NA	7 (7)
Idecabtagene vicleucel	2	128	94 (73)	10,7	8,8	24,8	84 (5)	18 (3)	17 (14)
Ciltacabtagene autoleucel	1B-2	97	95 (98)	NR	NR	NR	95 (5)	22 (12)	16 (17)
Teclistamab	1-2	165	104 (63)	18,4	11,3	18,3	72 (1)	14 (1)	19 (12)
<b>BCMA-CD3 anticuerpos biespecíficos en desarrollo clínico</b>									
Elranatamab	2	94	57 (61)	NA	NA	NA	61 (0)	2 (0)	1 (1)
ABBV-383	1	118	NA	NA	NA	NA	54 (3)	5 (NA)	6 (5)
Linvoseltamab (REGN5458)	1	73	37 (51)	NA	NA	NA	38 (0)	4 (0)	5 (7)
Pavurutamab (AMG701)	1	85	21 (26)	NA	NA	NA	65 (9)	NA	4 (5)
Alnuctamab (CC-93269)	1	30	13 (43)	NA	NA	NA	77 (3)	NA	3 (10)
<b>No BCMA-CD3 anticuerpos biespecíficos en desarrollo clínico</b>									
Talquetamab (GPRC5D-CD3)	1-2	74	49 (66)	10,2-13 dos dosis	NA	NA	78 (1)	NA	NA
Cevostamab (FCRL5-CD3)	1-2	161	64 (45)	11.5	NA	NA	81 (1)	14 (1)	6 (4)

**Tabla 3. Nuevos tratamientos para el MM/RR.**

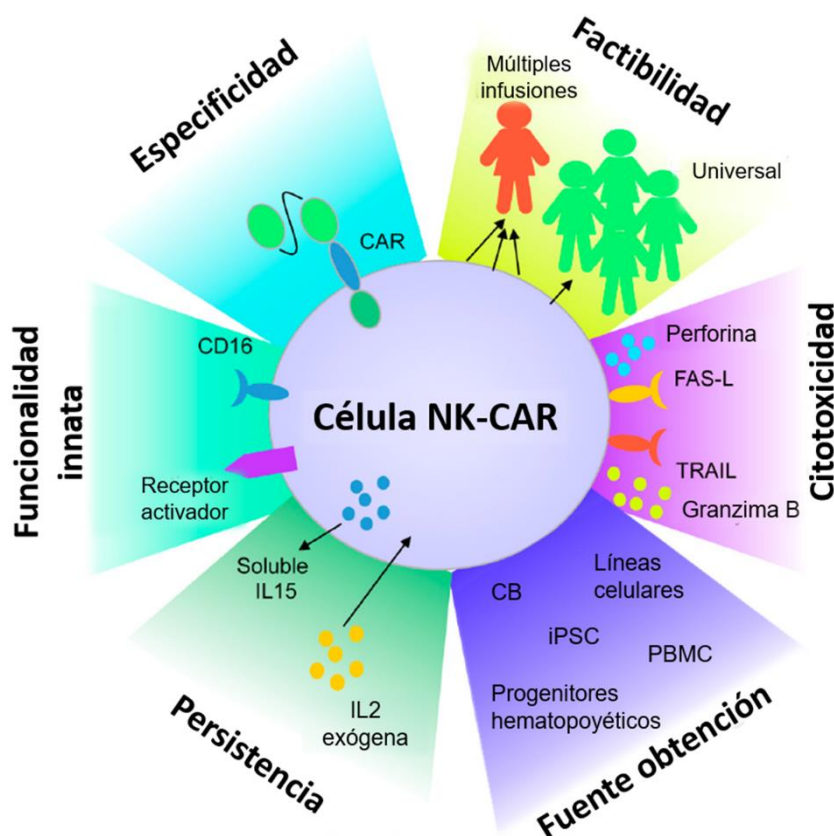
Terapias y anticuerpos Biespecíficos (BiTEs) en desarrollo clínico y aprobados por la FDA para el tratamiento de MM/RR que ya han recibido previamente un agente inmunomodulador, un inhibidor de proteasoma y un anticuerpo anti-CD38. Adaptada de Mailankody, Landgren. N Engl J Med. 2022 Aug 11;387(6):558-561. [262].

### 3. INMUNOTERAPIA NK-CAR EN MM

A pesar de los resultados prometedores que ofrece la terapia T-CAR, existen algunas limitaciones tras la administración de la terapia T-CAR como la neurotoxicidad asociada a células inmunes (ICANS), que aparece en el 20% de los casos, y el riesgo de desarrollar

CRS en el 85-95% de los casos [263], así como linfohistiocitosis hemofagocítica [264], citopenias prolongadas y toxicidad en la diana fuera del tumor (en inglés *on-target off-tumor*) [265]. Además, la terapia T-CAR conlleva una complejidad asociada a su manejo, un elevado coste, fallos de producción debido a células procedentes de pacientes politratados [244] y probabilidad de contaminación por el tumor [266]. La terapia T-CAR autóloga conlleva también un tiempo prolongado desde que se obtienen los efectores autólogos T hasta que se modifican y se vuelven a infundir al paciente, ya que no se puede emplear la terapia T-CAR en contexto alogénico sin edición genómica, por su elevado riesgo de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) [267].

Recientemente, ha emergido la terapia con células NK-CAR por sus únicas y múltiples ventajas biológicas, como su nula toxicidad, con riesgo mínimo de desarrollar EICH ni CRS graves [268] y uso potencial tanto en contexto autólogo como alogénico. Un estudio reciente ha demostrado la desaparición de efectos tóxicos en la diana fuera del tumor en la transición T-CAR a NK-CAR en un modelo de LMA con un CAR de CD123 [269]. La vida media de una células NK es alrededor de 2 semanas [270]. Sin embargo, se puede aumentar su persistencia in vivo mediante el uso de citoquinas como IL-2 o IL-15 [271]. Los efectos adversos asociados al CAR se ven reducidos debido a la corta vida media de una NK, por lo que en la mayoría de los casos no se requiere la expresión adicional de interruptores suicidas [272, 273]. Además, estos efectores inmunes son capaces de llevar a cabo citotoxicidad independientemente del CAR gracias a sus receptores naturales. A diferencia de la terapia T-CAR autóloga, la terapia NK-CAR en contexto alogénico producida desde donantes sanos reduce costes, tiempos de producción y constituye un producto “listo para su uso” sin necesidad de edición genómica. La fácil y rápida disponibilidad de células NK alogénicas permite la administración de múltiples infusiones de NK-CAR, sin necesidad de aumentos en el tiempo de espera para los pacientes graves [274].



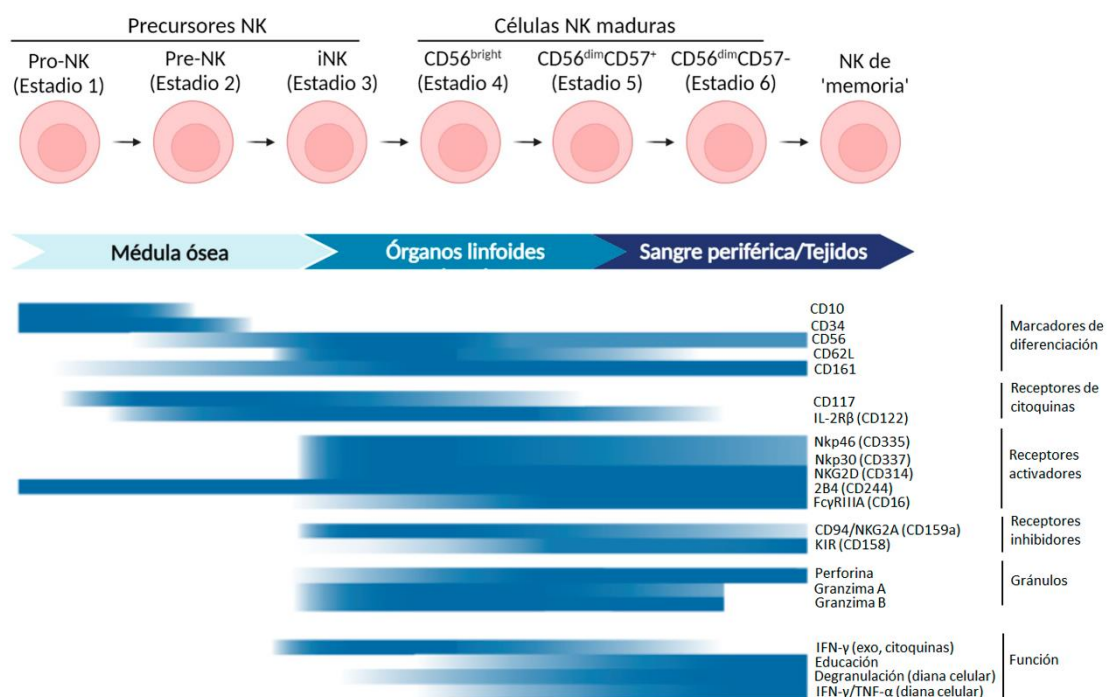
**Figura 10.** Propiedades relevantes derivadas del uso de las células NK-CAR.

Las células NK se pueden obtener de distintas fuentes y pueden modificarse para redirigir su especificidad frente a antígenos tumorales a través de la expresión de una molécula CAR. Las células NK se pueden expandir ex vivo hasta alcanzar cantidades clínicas significativas. Presentan características innatas como la presencia de receptores activadores, incluyendo CD16 que permite atacar al tumor a través de ADCC, otorgando funcionalidad de manera independiente al CAR. *CB*: cordón umbilical; *PBMC*: células mononucleadas de sangre periférica; *iPSC*: células madre pluripotentes inducidas; *FAS-L*: ligando de *FAS*; *IL2*: interleuquina 2; *IL15*: interleuquina 15; *TRAIL*: factor de necrosis tumoral relacionado con el ligando de inducción de apoptosis. Modificada de Sivori, Meazza et al. J Clin Med. 2019 Oct 16;8(10):1702. [274]

### 3.1. Propiedades nativas de la célula NK por las que superan a la inmunoterapia con células T

Las células NK son efectores inmunes innatos que derivan de un progenitor linfoide común en la MO y que pasan por 6 estadios de diferenciación desde NK inmaduras a maduras, distribuyéndose después a los distintos órganos linfoides secundarios y tejidos, principalmente sangre periférica (SP), hígado, bazo y pulmón. En los tres últimos estadios de maduración, las células NK pierden expresión de CD62L, NKG2A, CCR7 y CXCR3, mientras que la expresión de CD57, CD16, KIR, NKG2D y perforina aumentan (Fig. 11) [275, 276]. Tradicionalmente, las células NK también han sido clasificadas en

inmunomoduladoras (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-dim</sup>), más inmaduras y localizadas preferentemente en tejidos linfoides secundarios [277], y NK maduras (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup>), con función citolítica y se encuentran preferentemente inmunovigilando en sangre periférica [278]. Además de estas dos poblaciones, recientemente se ha descrito una población de células NK CD56<sup>-</sup>NKp46<sup>+</sup> que, en individuos sanos, se encuentran en baja proporción pero son abundantes en infecciones virales crónicas o agudas [279]. La función principal de una célula NK es identificar y eliminar las células estresadas, infectadas por virus o senescentes, además de controlar las células tumorales y metástasis [280, 281]. Las células NK representan alrededor del 10% de los linfocitos circulantes en SP.



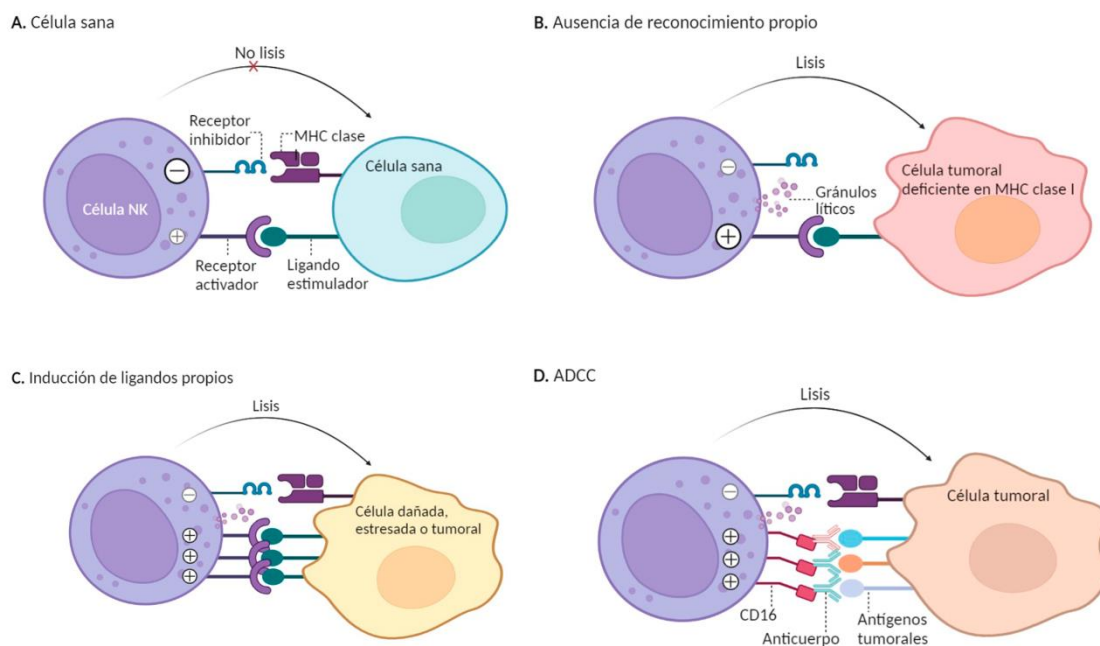
**Figura 11. Representación esquemática del desarrollo y diferenciación de las células NK.**

Adaptada de Cichocki, Miller, Anderson, Bryceson. Front Immunol. 2013 Feb 28; 4:55.

A diferencia de las células T, que producen un perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-8 o IL-6, responsables de la mayoría de las complicaciones anteriormente descritas, la corta vida media de una NK además de la secreción de un perfil de citoquinas inmunoreguladoras distinto (como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF e IL-3), son probablemente responsables de las ventajas en cuanto a seguridad de la terapia NK-CAR [272]. Otra de las ventajas de las células NK es que el riesgo de producir EICH es mínimo ya que su respuesta no está restringida por el sistema antígeno



leucocitario humano HLA, a diferencia de las células T, cuya activación depende del reconocimiento antigénico por las moléculas HLA a través del TCR [282]. Las células NK son capaces de reconocer células sanas a través de un balance entre señales activadoras e inhibitoras (Fig. 12a) generadas desde distintos receptores de línea germinal (Fig. 13). Además, son capaces de reconocer y eliminar células tumorales que no expresan moléculas del MHC de clase I propias (Fig. 12b) [283], así como lisar células dañadas o inducidas por estrés a través del reconocimiento de ligandos por sus receptores activadores, sobrepasando la señal inhibitoria (Fig. 12c) [284].



**Figura 12. Representación esquemática de las funciones de la célula NK.**

MHC, complejo mayor de histocompatibilidad. Imagen adaptada de Morvan MG & Lanier LL, Nature Reviews, 2016. [284].

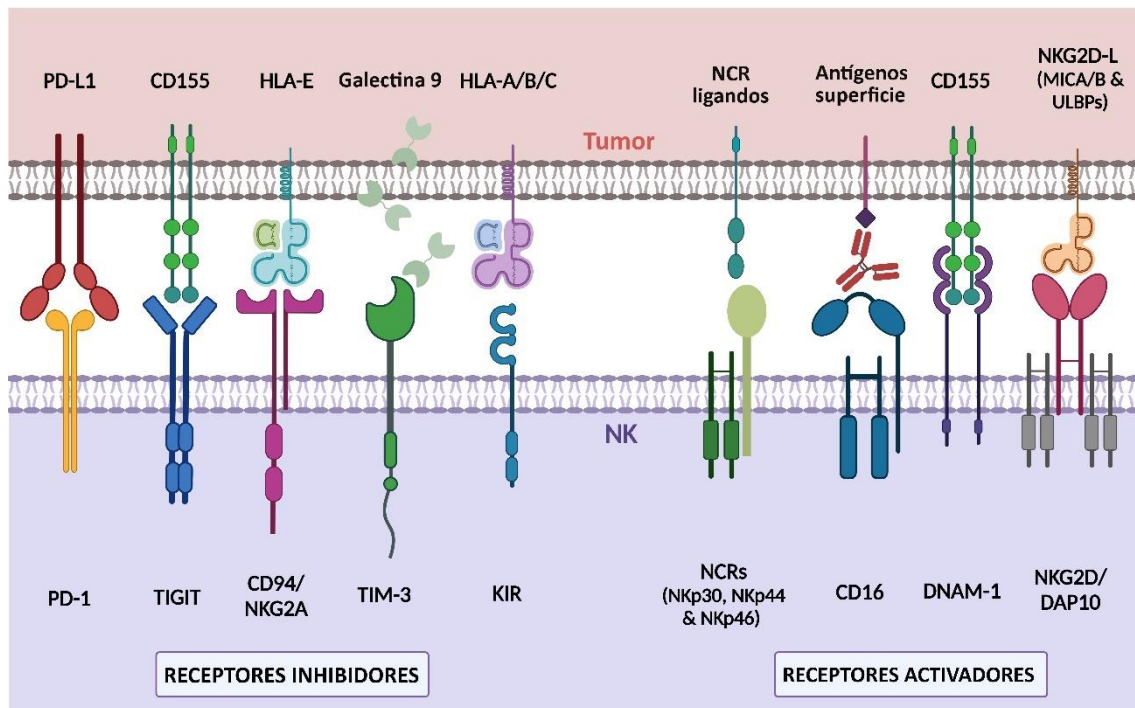
Entre los receptores activadores de una NK se encuentran el receptor NKG2D (CD314), DNAM1 (DNAX molécula accesoria 1), el receptor CD16 y los receptores naturales de citotoxicidad (NCRs). NKG2D se ha mencionado anteriormente y es uno de los principales receptores activadores de las células NK. Otro receptor activador importante es DNAM-1, es una glicoproteína transmembrana que actúa como coreceptor [285] y reconoce los ligandos del receptor de poliovirus (PVR) y Nectin-2 sobreexpresados en células tumorales [286]. El receptor activador CD16 (FcγRIIIa) reconoce la región Fc de los anticuerpos IgG y es capaz de opsonizar células tumorales y eliminarlas vía citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) [287]. Los NCRs son NKp30 (CD337),

NKp44 (CD336) y NKp46 (CD335), receptores transmembrana de tipo I que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas [274]. El receptor activador CD94/NKG2C es un receptor heterodímero compuesto por proteínas de tipo II que reconocen la molécula de histocompatibilidad tipo I no clásica HLA-E.

Entre los receptores inhibidores se encuentran los receptores específicos de HLA: los miembros de la familia KIR/CD158 (*killer cell immunoglobuline-like receptor*) y el heterodímero CD94/NKG2A (“*natural killer grupo 2A*”). CD94/NKG2A es un receptor transmembrana de tipo II que reconoce HLA-E, caracterizada por un polimorfismo limitado [288]. Los receptores KIR son una familia de genes polimórficos que codifican para receptores activadores o inhibidores, y cuya nomenclatura hace referencia a su estructura y función [289]. KIR2D y KIR3D indica si posee dos o tres dominios extracelulares, seguido de L (*long*) o S (*short*) por la cola citoplasmática que contenga. Normalmente, los KIR inhibitorios poseen una cola citoplásmica larga con motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM), que transmiten señales inhibitorias a través del reclutamiento de tirosina fosfatasas. Y a la inversa, los KIR activadores poseen dominios citoplásmicos cortos que contienen motivo activador inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), que van a transmitir señales activadoras [284]. Otros receptores inhibidores se clasifican como inhibidores del punto de control inmunitarios. El más estudiado es PD-1, se expresa principalmente en células T aunque aparece en células NK en los pacientes con cáncer [274]. PD-1 reconoce PD-L1, con baja expresión en tejido sano pero sobreexpresado en numerosos tipos de tumores como mieloma múltiple [290], y PD-L2, expresado en tumores sólidos y células presentadoras de antígenos [291]. Los puntos de control inhibitorio TIGIT (*T-cell Ig and ITIM domains*) y CD96 compiten con el receptor activador DNAM-1 por la unión a PVR y Nectin-2, moléculas frecuentemente sobreexpresadas en células tumorales [286]. TIM-3, otro punto de control inhibitorio, es una glicoproteína de tipo 1 expresada por linfocitos Th17, células T reguladoras, células dendríticas y NK maduras, y se asocia a la supresión de células T CD8<sup>+</sup> y células NK [292].

A diferencia de las células T, las células NK son capaces de mediar citotoxicidad independientemente del CAR a través de sus receptores innatos, incluso en escenarios caracterizados por pérdida del antígeno del CAR o disminución de su expresión. Las células NK son capaces de llevar a cabo lisis directa sobre la célula tumoral por exocitosis de gránulos de granzima B y perforina [293], así como por activación de rutas de muerte

celular, como las mediadas por TRAIL y sus receptores o la interacción FAS/FAS-L [294], o ADCC mediada por CD16 [295]. Además, poseen la capacidad de secretar citoquinas como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en respuesta a estímulos [296].



**Figura 13.** Expresión de los receptores activadores e inhibidores más importantes de una célula NK.

La activación de las células NK es mediada por un balance de señales generadas por receptores activadores e inhibidores. Los receptores inhibidores (a la izquierda) reconocen proteínas propias expresadas normalmente por células sanas. La pérdida de su expresión, generalmente causada por infecciones virales o transformaciones celulares, desencadena la activación de la célula NK por reconocimiento de "pérdida de lo propio". Los receptores activadores (a la derecha) reconocen ligandos inducidos en células tumorales o infectadas por virus. PD-1: *programmed death-1*; TIGIT: *T cell Ig and ITIM domain*; TIM-3: *T cell Ig and mucin-domain containing-3*; KIR: killer-cell Ig-like receptor; NCRs: receptores naturales de citotoxicidad; DNAM-1: DNAX molécula accesoria 1; NKG2D/DAP10: NK del grupo 2D/DNAX-proteína de activación 10; PD-L1: PD-1 ligando; HLA-E: HLA de clase I, cadena alfa E; HLA-A/B/C: HLA clase I, cadena alfa A/B/C; NKG2D-L: ligandos de nkg2d; MICA/B: MHC clase I relacionado con polipéptido A/B; ULBPs: proteínas de unión a UL16. Modificada de Valeri, García-Ortiz et al. *Front Immunol.* 2022 Aug 3; 13:953849. [133]

### 3.2. Fuentes de obtención de células NK para inmunoterapia NK-CAR

Existen diversas fuentes para la obtención de células NK para inmunoterapia adoptiva: células NK de sangre periférica (SP-NK), de sangre de cordón umbilical (CB-NK), líneas celulares de NK (como NK-92), células madre derivadas de NKs generadas desde células madre inducidas pluripotentes (iPSCs) y embrionarias o de progenitores

hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> [297]. Las SP-NK son células maduras con una gran capacidad citotóxica. Sin embargo, estas células son refractarias a la transducción y representan un producto heterogéneo [298]. Las células NK derivadas de iPSCs representan una fuente ilimitada y homogénea de NKs y con facilidad para ser editadas genéticamente, sin embargo, su manejo es complejo y requiere especialización [299, 300]. Las células NK derivadas desde progenitores CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical se pueden obtener desde unidades congeladas o en cultivo fresco [301].

### 3.2.1. Línea celular NK-92

NK-92 es una línea celular de NK inmortalizada de un paciente con linfoma agresivo de tipo no-Hodgkin. Además de NK-92, se han desarrollado otras 6 líneas celulares de NK inmortalizadas de pacientes con linfoma de NK: NK-YS, KHYG-1, NKL, NKG, SNK-6 y IMC-1 [302]. Sin embargo, la única aprobada para uso clínico es NK-92 [303, 304]. Por seguridad, estas células deben ser irradiadas (10 Gy) antes de su uso clínico. Esta dosis consigue eliminar completamente su capacidad proliferativa [305], pero que disminuye considerablemente su vida media.

La línea celular NK-92 consiste en un producto homogéneo, son células NK puras, capaces de proliferar y expandir fácilmente en cultivo, preservan su actividad citotóxica incluso tras ciclos repetidos de congelación/descongelación, y representan una terapia instantánea (*ready to use*), a menor coste que otras terapias personalizadas. Estas células fueron desarrolladas por el grupo de Hans Klingemann (Culver City, California, EEUU). Se trata de una línea celular dependiente de IL-2 y que presenta un fenotipo de célula NK activada: positivo para CD2, CD7, CD11a, CD25 (receptor de IL-2, cadena  $\alpha$ ), CD28, CD45, CD54 y CD56<sup>bright</sup>, y negativo para CD1, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20, CD23, CD34 y HLA-DR, y ha demostrado ser citotóxica en modelos in vitro frente a muchos tipos de cáncer, entre ellos mieloma múltiple [306].

A diferencia de las células NK primarias, NK-92 carece del receptor CD16, por lo que no puede desencadenar ADCC. Se ha llevado a cabo la modificación genética de la línea NK-92 para que exprese el receptor CD16 y así poder desencadenar ADCC [307, 308]. Esta línea celular modificada se denomina “haNK” y se ha empleado también en ensayos clínicos, demostrando seguridad y efectividad cuando se usan en combinación con anticuerpos monoclonales o en presencia de moléculas CAR [309-312]. Esta línea celular

expresa los receptores inhibidores NKG2A/CD94 y LIR-1 [313], y carece de receptores KIR a excepción de KIR2DL4, que posee una función activadora a pesar de tener un motivo ITIM inhibidor [314], y aunque no cuenta con el receptor activador Nkp44, expresa en su membrana NKG2D, NKp30, NKp46 y 2B4 [313]. Por esta razón, posee una gran capacidad citotóxica frente a un amplio espectro de tumores [306, 315, 316].

La línea celular NK-92 necesita IL-2 para su crecimiento y subsistencia. Sin embargo, se han asociado toxicidades a la administración de altas dosis de IL-2 en humanos [317]. Con el fin de mejorar tanto la capacidad citotóxica de esta línea celular como su persistencia in vivo, se han llevado a cabo una serie de modificaciones genéticas. Las denominadas células NK-92MI son células NK-92 a las que se le ha transfectado el cADN de la IL-2 humana para crear una variante independiente de IL-2, ya que es capaz de autoproducirla por sí misma [316]. Esta modificación no varía la capacidad citotóxica de la línea celular, pero sí aumenta la sensibilidad a la irradiación, lo que podría suponer un problema en la clínica ya que por seguridad hay que irradiar estas células antes de su infusión a los pacientes y su capacidad antitumoral podría verse comprometida. Algunos estudios han reportado que la irradiación de las células NK-92MI limita su capacidad citotóxica in vivo [318]. Hasta el momento, la FDA solo ha autorizado la utilización clínica de la línea celular NK-92 dependiente de IL-2 e irradiada a 10Gy.

Algunos modelos preclínicos frente a MM utilizando distintas dianas terapéuticas han demostrado la eficacia de la inmunoterapia NK-92 CAR, como en el reconocimiento de CD138 [319] y de CS1 [320]. Sin embargo, en el caso del CAR anti-CD138 existen dudas para su uso clínico por la toxicidad generada fuera del tumor, ya que CD138 se expresa en muchos tejidos sanos como células endoteliales, estromales y mesenquimales, entre otros [321, 322]. En el caso de CS1, puede existir fratricidio porque esta diana se expresa en las propias células NK, T activadas, células dendríticas y monocitos [226]. En este mismo sentido, Hambach y col. diseñaron células NK-92 CD38 CAR potencialmente fratricidas a partir de la región VHH del anticuerpo (nanobody) y demostraron actividad anti-mieloma in vitro en células primarias de médula ósea de pacientes con MM [323].

Numerosos ensayos preclínicos utilizando ratones inmunodeficientes han demostrado que las células NK-92 irradiadas 10Gy no son tumorigénicas [315, 318, 320, 324]. Ensayos clínicos con NK-92 también han demostrado seguridad a altas dosis (hasta  $5 \times 10^9$ ), sin complicaciones a corto ni largo plazo [325-328]. Sin embargo, la eficacia

antitumoral de la línea parental es limitada, por eso distintos grupos intentan la modificación genética de las células NK-92 para expresar una molécula CAR. Hasta el momento, hay 6 ensayos clínicos con NK-92 CAR para el tratamiento de enfermedades hematológicas (Tabla 4). El primer ensayo clínico que demostró seguridad fue con el CAR CD33 frente a leucemia mieloide aguda (LMA), utilizando dosis de hasta  $5 \times 10^9$  células por paciente. No se produjeron respuestas estables, solo un paciente presentó una respuesta corta y recayó de la leucemia aguda a las 3 semanas [329], por lo que los autores sugirieron que la aplicación más apropiada de las células NK-92 CAR sería en terapia puente antes de un trasplante alogénico.

### 3.2.2. Células NK de sangre de cordón umbilical (CB-NK)

Las células NK de sangre de cordón umbilical (CB-NK) constituyen aproximadamente hasta un 30% de los linfocitos [330], sin embargo, el número de células mononucleadas es menor que el de otras fuentes de NKs, por ejemplo desde aféresis de SP, limitando el número de células destinadas a terapia CAR que se pueden obtener de una unidad de cordón umbilical [331]. Además, a diferencia de las líneas celulares de NK, las CB-NK constituyen una fuente de células heterogéneas. Las CB-NK inicialmente se han caracterizado como células más inmaduras que las de SP-NK [332], con menor expresión de receptores inhibidores KIR y mayor expresión de NKG2A [332, 333]. En cuanto a los receptores activadores, presentan una menor expresión de DNAM-1, NKG2C y CD16 [332, 333] y exhiben una menor capacidad citotóxica que las de SP-NK [334], aunque se ha reportado que los distintos procesos de activación y expansión pueden inducir su maduración y resultar igual de citotóxicas que las SP-NK. Esta activación y expansión se puede adquirir cuando se inducen con citoquinas como IL-2 e IL-15 [298, 335], así como con el cocultivo con células presentadoras de antígenos (o *feeder cells*) que suelen expresar IL-21 o IL-15 en membrana o el ligando 4-1BB [336]. Además, presentan otras ventajas como una mayor eficacia de transducción [337, 338], la posibilidad de criopreservación [339, 340], que facilita su disponibilidad para desarrollar una inmunoterapia NK alogénica instantánea, con capacidad de expansión para producir múltiples dosis de un solo donante para uso clínico [338]. Es más, el bajo número de células T presente en una unidad de cordón reduce la probabilidad de que ocurra EICH [334]. Adicionalmente, las células CB-NK expresan altos niveles de CXCR4 comparado

con las células SP-NK, lo que sugiere un mayor potencial para migrar a la médula ósea [332].

### 3.3. Estudios preclínicos y ensayos clínicos en MM con células NK-CAR procedentes de SP y de cordón umbilical

Numerosos estudios preclínicos han demostrado la viabilidad, seguridad y eficacia de la terapia NK CAR frente a distintos tumores oncohematológicos. Nuestro grupo ya ha demostrado previamente que las células NK autólogas de sangre periférica transducidas con el CAR-NKG2D son eficaces tanto in vitro como in vivo frente a MM [341]. Otros ensayos preclínicos utilizando el CAR-BCMA en células NK de distintas fuentes han corroborado resultados parecidos. Por ejemplo, Ng y colaboradores utilizan células NK de SP que integran, junto con el BCMA CAR, la expresión de la quimiocina CXCR4 para mejorar su migración a la MO [342]. Otra estrategia emplea células NK-92 transducidas con un CAR dual BCMA-CD19 con actividad anti-tumoral frente a células primarias de B-LLA y MM [343]. Wang y colaboradores utilizan células NK de SP transducidas con el CAR BCMA y además IL-15 y MyD88/CD40 para potenciar la actividad anti-tumoral frente a MM [344]. Los autores reportan en este trabajo una optimización basada en la coestimulación del CAR de primera generación, a través de la expresión de una molécula independiente y el aumento de la persistencia in vivo de las células NK-CAR mediante la expresión paracrina de la IL-15. En el caso de células CB-NK, un único estudio preclínico ha reportado que las células CB-NK BCMA-CAR presentan eficacia solo a dosis clínicas muy altas. Sin embargo, la población CB-NK permite a dosis reducidas aumentar la eficacia antitumoral y persistencia de las células T-CAR cuando se administran en combinación frente a MM [345]. Mas allá de BCMA como diana, otros grupos han explorado el redireccionamiento de las células NK CAR con un CAR anti-CD38. Dado el perfil de expresión de esta diana que abordamos anteriormente, el uso de estos efectores produce efectos adversos fuera del tumor, como una potente mieloablación y es potencialmente fratricida sobre las propias células NK. Para solventar estas limitaciones y combinar su uso con daratumumab, células NK CAR primarias se han conseguido modificar con edición genómica CRISPR-Cas9 en dos estudios independientes [346, 347], lo que va a permitir en un futuro su traslación a la clínica.

El primer ensayo clínico (NCT03056339) que ha utilizado células CB-NK transducidas con el CAR CD19, IL-15 y la terapia suicida iCasp9 [338] ha demostrado una potente

eficacia antitumoral frente linfomas CD19<sup>+</sup> R/R, sin toxicidades asociadas y una persistencia de las células CB-NK CAR de más de 12 meses en algunos pacientes. La tasa de respuesta global en este ensayo fue del 73% [268], lo que sugiere una eficacia similar a las obtenidas con células T-CAR. Hasta el momento, no se ha registrado ningún ensayo clínico para MM con células NK con el CAR-NKG2D. En el caso de células NK-CAR BCMA, se han registrado 3 ensayos clínicos (NCT05182073, NCT03940833, NCT05008536). Los dos últimos, en los que se emplea como inmunoterapia células NK-92 o CB-NK, no se relacionan con ninguna preclínica publicada asociada. Por tanto, existe una carencia de datos preclínicos que justifiquen el uso de células primarias NK CAR NKG2D y CAR BCMA en el tratamiento de MM. En la Tabla 4 se muestran los ensayos clínicos NK-CAR registrados para el tratamiento de enfermedades hematológicas.



Nº	Estado	Patología	Construcción/ combinación	Fuente NK	Fase	Nº pac.	País	Nº ensayo
1	Recl.	LMA	NKG2D CAR	CB	Fase 1	9	China	NCT05247957
2	Recl.	LNH	CD19 CAR	Donante haploideéntico (SP)	Fase 1	25	China	NCT04887012
3	Recl.	LMA	CD33/CLL1 CAR	Desc.	Fase 1 temprana	18	China	NCT05215015
4	En espera	LNH	CD19 CAR	Desc.	Fase 1 temprana	9	China	NCT04639739
5	Recl.	LMA	CD33 CAR	Desc.	Fase 1	27	China	NCT05008575
6	Desc.	Linfoma de células B refractario	CD22 CAR	Desc.	Fase 1 temprana	9	Desc.	NCT03692767
7	Desc.	Linfoma de células B refractario	CD19 CAR	Desc.	Fase 1 temprana	9	Desc.	NCT03690310
8	Recl.	MMRR	BCMA CAR	CB	Fase 1 temprana	27	China	NCT05008536
9	Recl.	MM	BCMA CAR	Línea celular NK-92	Fase 1/2	20	China	NCT03940833
10	Desc.	Linfoma de células B refractario	CD19/CD22 CAR	Desc.	Fase 1 temprana	10	Desc.	NCT03824964
11	Recl.	SMD RR	NKX101 (NKG2D CAR/mbIL-15)	Donante haploideéntico (SP)	Fase 1	90	EEUU	NCT04623944
12	Recl.	Leucemia de células B, MW, Linfoma de células B	NKX019 (CD19 CAR/mbIL-15)	Donante (SP)	Fase 1	60	EEUU, Australia	NCT05020678
13	Desc.	LMA, LNLA	CD33 CAR	Línea celular NK-92	Fase 1/2	10	China	NCT02944162
14	Recl.	LLA, LLC, LNH	CD19 CAR	CB	Fase 1	27	China	NCT04796675
15	Desc.	Leucemia de células B, Linfoma de células B	CD19 CAR	Línea celular NK-92	Fase 1/2	10	China	NCT02892695
16	Retir.	Linfoma de células B	CAR CD19/iCasp9/IL15 + Rituximab	CB	Fase 1/2	0	EEUU	NCT03579927
17	Activo, en espera	Leucemia de células B, Linfoma de células B	iCasp9/CAR CD19/IL15 + AP1903	CB	Fase 1/2	36	EEUU	NCT03056339
18	Recl.	MM	FT576 (BCMA CAR) + Daratumumab	iPSCs	Fase 1	168	EEUU	NCT05182073
19	Recl.	Linfoma de células B, SMD, LMA	CAR CD70/IL15	CB	Fase 1/2	94	EEUU	NCT05092451

20	En espera	Enfermedades CD19+	CNTY-101 (CAR CD19/EGFR/IL15) + IL-2	iPSCs	Fase 1	75	Desc.	NCT05336409
21	En espera	Enfermedades hematológicas	CAR CD5/IL15	CB	Fase 1/2	48	EEUU	NCT05110742
22	Desc.	Leucemias CD7+ o linfomas	CD7 CAR	Línea celular NK-92	Fase 1/2	10	China	NCT02742727
23	Recl.	Linfoma de células B	FT596 (CD19 CAR)	iPSCs	Fase 1	50	EEUU	NCT04555811
24	Recl.	Linfoma de células B, LLC	FT596 (CD19 CAR) + Rituximab	iPSCs	Fase 1	285	EEUU	NCT04245722
25	Compl.	LMA	CD19 CAR	Donante haploideéntico (SP)	Fase 1	14	EEUU	NCT00995137
26	Retirado	Linfoma de células B difuso	CD19 CAR	NK-92 modificada (haNK)	Fase 1	0	EEUU	NCT04052061
27	Susp.	LLA	CD19 CAR + IL-2	Donante haploideéntico (SP)	Fase 1	20	Singapur	NCT01974479
28	Desc.	Leucemia de células B, Linfoma de células B	CD19 CAR	Línea celular NK-92	Fase 1/2	10	China	NCT02892695
29	Recl.	LNH de células B	CAR CD19/IL15	CB	Fase 2	242	EEUU	NCT05020015
30	Recl.	LLA de células B, Linfoma de células B	QN-019a (CAR CD19) +/- Rituximab	Alogénico	Fase 1	24	China	NCT05379647
31	Recl.	LLA, LLC, LNH	CD19 CAR	Donante (SP)	Fase 1	15	China	NCT05410041

**Tabla 4. Ensayos clínicos registrados actualmente con células NK-CAR para enfermedades hematológicas.**

Recl., reclutando; Desc., desconocido; Compl., completado; Susp., suspendido; Retir., retirado; LMA, leucemia mieloide aguda; LNH, linfoma no-Hodgkin; SMD, síndrome mielodisplásico; RR, en recaída/refractario; LLA, leucemia linfocítica aguda; LNLA, leucemia no linfocítica aguda; LLC, leucemia linfocítica crónica; MW, Macroglobulinemia de Waldenstrom; SP, sangre periférica; CB, sangre de cordón umbilical. Modificada de Valeri, García-Ortiz et al. *Front Immunol.* 2022 Aug 3; 13:953849. [133]

### 3.4. Terapias en combinación con inmunoterapia NK CAR en MM

Distintas estrategias en combinación con la terapia NK-CAR pueden actuar potencialmente en sinergia y aumentar la eficacia de estas terapias adoptivas. Por ejemplo, moléculas inhibitoras pequeñas que inducen la maduración e incrementan la potencia lítica de la célula NK [348]; inmunomoduladores como la lenalidomida que pueden aumentar la ADCC; moduladores epigenéticos que incrementan la expresión de antígenos asociados a tumor y restauran la inmunogenicidad de las células tumorales

[349]. Otras estrategias consisten en el uso de adenovirus oncolíticos que aumentan la inmunogenicidad y potencian el reclutamiento al sitio del tumor, promoviendo persistencia de la NK CAR en el microambiente tumoral e incrementando su citólisis [350]; anticuerpos contra inhibidores de puntos de control (IPC) que pueden eliminar señales negativas impidiendo el agotamiento del efector NK CAR [351]; anticuerpos bi-específicos en combinación con terapia NK CAR [352] o con quimioterapia elastogénica que induce daño en el ADN [353], que será abordada en el capítulo 3.6.

Brevemente, ensayos clínicos que han combinado previamente la terapia T-CAR BCMA con un inhibidor PI3K (NCT03274219) para favorecer la activación de la célula T [354], o con lenalidomida (NCT03070327) [355] ofrecen pistas para la potenciación de la actividad NK CAR porque pueden, adicionalmente, disminuir el umbral de activación de la célula NK e incrementar la expresión de CD16a (ADCC) [356]. En general, los inhibidores de histona deacetilasas (iHDAC) inducen transcripcionalmente los ligandos de NKG2D [357]. Por ejemplo, la romidepsina, un inhibidor de HDAC1/HDAC2, es capaz de aumentar la expresión de NKG2D-L en la membrana de las células de cáncer de pulmón, sensibilizándolas al ataque de las células NK [357, 358]. Afolabi y col. han demostrado recientemente sinergia en la combinación de un inhibidor pan-HDAC, como es Panobinostat y la citólisis NK de la célula tumoral, mediada por el aumento en la expresión de proteínas de adhesión y uniones estrechas [349].

La terapia T-CAR en combinación con anticuerpos contra IPC, como PD-1, se ha implementado en el tratamiento de pacientes con tumores hematológicos en recaída o refractarios al tratamiento con una eficacia inicial prometedora. Hasta el momento hay 10 ensayos clínicos en marcha que combinan la terapia T-CAR con una terapia anti PD-1, ya sea mediante el bloqueo de PD-1 con un anticuerpo anti-PD-1, o bien células T-CAR redirigidas directamente para eliminar la expresión de PD-1. Uno de estos ensayos clínicos tiene como indicación el MM/RR. Consiste en la combinación de la inmunoterapia BCMA CAR con efectores autólogos T, que secretan una proteína de fusión mutante PD-1 Fc capaz de bloquear el eje inhibitorio PD-L1/PD-1 (NCT04162119). En este sentido, un estudio preclínico ha conseguido aumentar la eficacia antitumoral combinando la terapia NK CAR con un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 en tumor sólido, inhibiendo este IPC en las células NK-92 CAR [359]. De forma paralela, Liu y col. han desarrollado un tratamiento con células anti-PD-L1 NK CAR en combinación con el anticuerpo anti-PD1, Nivolumab, para vulnerar la inmunosupresión

en el microambiente del tumor sólido y potenciar la función de los efectores NK CAR [351]. Una de las estrategias más avanzadas hasta la fecha es el redireccionamiento de células NK CAR con anticuerpos bi-específicos para células NK (BiKEs). Zhang y col. han publicado recientemente una aproximación con eficacia potenciada y muy versátil para eliminar tumores sólidos con gran heterogeneidad antigénica, que consiste en la combinación de un BiKE de NKG2D- ErbB2 con células NKG2D CAR NK [352].

### 3.5. Mecanismos de acción antitumorales descritos de los inhibidores de gamma-secretasas (GSI) en monoterapia, en combinación con inmunoterapia CAR o con bortezomib

Las  $\gamma$ -secretasas son complejos de proteasas de múltiples subunidades que escinden una gran variedad de proteínas transmembrana de tipo I de la superficie celular, entre ellas BCMA, disminuyendo así la densidad de receptores BCMA anclados a la membrana. De esta forma, se ha propuesto el uso de inhibidores de  $\gamma$ -secretasas (GSI) para aumentar la cantidad de receptores BCMA en membrana y disminuir la cantidad de sBCMA que puede producir el escape de las células de mieloma por parte de las células T-CAR BCMA o cualquier otra terapia anti-mieloma dirigida contra BCMA. Se ha demostrado que el uso combinado de inhibidores de gamma secretasas y terapia T-CAR mejora el reconocimiento de las células de mieloma por parte de las células T-CAR BCMA e incrementa la eficacia antitumoral frente a MM/RR [178, 179]. Esta combinación se está empleado en ensayo clínico (NCT03502577), demostrando eficacia incluso en pacientes que habían recaído tras recibir una terapia previa anti-BCMA [360]. Algunos GSI se comportan como inhibidores de Notch. En concreto, el GSI Crenigacestat (LY3039478) impide la liberación del dominio intracelular de Notch, NICD, [361] e inhibe la migración y proliferación tumoral [362]. Crenigacestat es un fármaco con un buen perfil de seguridad empleado previamente en ensayos clínicos [363, 364], donde se han descrito algunas toxicidades leves, como toxicidad intestinal [365, 366]. Otros trabajos han descrito a los GSI como inhibidores directos del proteasoma que inducen apoptosis tumoral [367]. Los GSI son capaces de parar el ciclo celular [368] a través de un aumento en el inhibidor p21<sup>WAF1/cip1</sup> [367].

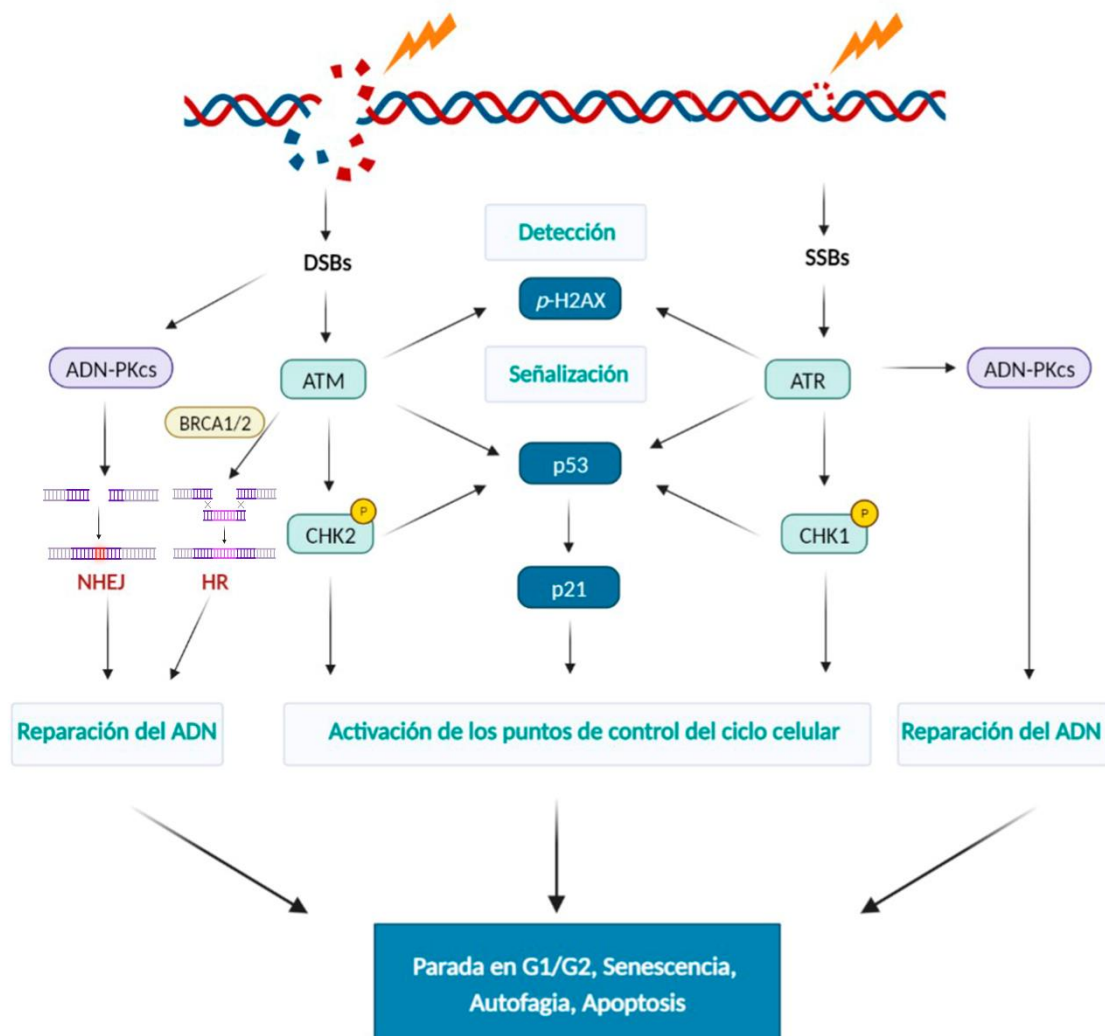
La combinación de BTZ más un GSI publicadas induce efecto sobre las rutas de proliferación o supervivencia celular, generalmente apoptosis. Un estudio en MM que combina BTZ y GSI-XII, otro inhibidor de gamma secretasa, indica que esta combinación

induce la apoptosis de las células tumorales por dos mecanismos independientes, la inhibición de la actividad del proteasoma y la inhibición de la señalización Notch [369]. En linfoma, BTZ más GSI-I, que es estructuralmente muy parecido a un inhibidor de proteasoma, producen la disminución de Notch1, pAKT y pERK [370]. Se ha descrito que la combinación de BTZ+GSI aumenta la producción de PARP, caspasa-3 y caspasa-8 cortadas e inhibe las rutas AKT/mTOR y ERK, disminuyendo significativamente los niveles de p-ERK, p-AKT y p-mTOR, comparado con los tratamientos de manera individual [371]. De hecho, en la ruta de Notch, NICD también interactúa con AKT y ERK1/2. La combinación BTZ+GSI puede activar adicionalmente la vía pro-apoptótica de p38, porque produce un aumento de los niveles de p-JNK, p-c-Jun y p-p38 [371].

### 3.6. Respuesta al daño en el ADN (DDR) y estrés genotóxico inducido por bortezomib (BTZ)

Brevemente, la respuesta a daño en el ADN o DDR (por sus siglas en inglés *DNA damage response*) es un mecanismo integral en respuesta al estrés genotóxico para mantener la integridad genómica, que promueve la detección, señalización y la reparación del ADN, modula la parada del ciclo celular y la transcripción, replicación, organización de cromatina y la inducción de apoptosis de células muy dañadas, sanas o tumorales [372]. Las roturas en el ADN, fundamentalmente las dobles roturas, que son las más peligrosas, deben ser reparadas de forma rápida y eficiente. En las células humanas pueden ser reparadas por dos rutas principales, la de reparación de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HR). La respuesta al daño en el ADN es iniciada por las quinasas ATM, que responde a dobles roturas en el ADN, y ATR, que responde a roturas simples y horquillas de replicación bloqueadas. ATM/ATR fosforilan otros sustratos, entre ellos Chk1, Chk2, o ADN-PKcs que a su vez se encargan de fosforilar y activar otras proteínas implicadas en la detección del daño en el sitio donde se ha producido la lesión, por ejemplo, la proteína 53BP1, el complejo MRE11-RAD50-NBS1 o la forma fosforilada de H2AX (*p*-H2AX) [373]. Estos factores, a su vez, participan en el anclaje de otras proteínas clave que van a decidir, en función de la fase del ciclo celular, por cuál de los mecanismos se va a reparar la lesión en el ADN, la subsiguiente parada estable del ciclo celular o la inducción de apoptosis, como el heterodímero Ku70/80, ADN-PKcs, BRCA1, RAD51 o p53, entre otros [372]. BRCA1 es reclutado para la reparación del ADN dañado por recombinación homóloga durante la fase S desplazando 53BP1 del sitio

de daño. El supresor tumoral p53 activado por ATM, ATR, Chk1 y Chk2 activa a su vez otras moléculas controladoras del ciclo celular, entre ellas p21, un regulador negativo de las quinasas dependientes de ciclinas por lo que es capaz de bloquearlo tras el daño [374]. La célula induce una parada de ciclo transitoria hasta que las lesiones puedan ser reparadas por alguno de estos mecanismos de reparación. Sin embargo, cuando ese daño supera un determinado umbral, las células entran en apoptosis, necrosis, autofagia o en senescencia (Fig. 14).



**Figura 14. Rutas de señalización de daño por roturas simples y dobles en el ADN.**

El daño en el ADN activa a las quinasas ATM y ATR, que transmiten la señal a sus dianas para promover la reparación del ADN por recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HR), además de activar las rutas de respuesta a parada del ciclo celular. Cuando el daño en el ADN no se puede reparar, se induce apoptosis, autofagia o senescencia en la célula. ADN-PKcs, subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN; p-H2AX, H2AX fosforilado. Adaptada de Ouellette, Zhou and Yan. 2022. *Diagnostics* 12, no. 3: 656. [375].

BTZ activa la respuesta DDR en células de mieloma y es capaz de aumentar la expresión de NKG2DL, como MICA [122]. Se ha publicado que BTZ también es capaz de producir la parada de ciclo en G2/M en células de cáncer de colon a través de la forforilación de ATM-Chk1 [376]. Algunos trabajos previos han relacionado la expresión de NKG2D-L y el ligando de DNAM, PVR, con la activación de las quinasas ATM/ATR por estrés genotóxico a baja dosis de BTZ, melfalán, doxorubicina o etopósido o inhibidores de la replicación del ADN, mientras que los mecanismos por los que se produce el control transcripcional que aumentan los NKG2D-L no ha sido todavía esclarecidos. El incremento en la expresión de NKG2DL produce la sensibilización de las células tumorales al ataque de las células NK. [191, 377].

Por otro lado, el tratamiento con BTZ, inhibiendo el proteasoma, provoca una reducción en la cantidad de ubiquitina disponible necesaria para la activación de proteínas clave en la reparación por recombinación homóloga, como BRCA1 y RAD51 [83]. Además, en línea con una mayor activación de la DDR, el tratamiento con BTZ induce la sobreexpresión de la proteína supresora de tumor p53 [367] y la fosforilación de CHK1 [376]. Existe evidencia demostrada que el tratamiento con BTZ sensibiliza a los tumores hematológicos a la citotoxicidad por la célula NK en un ensayo clínico (NCT00720785) utilizando NK autólogas [378]. Hasta la fecha, no se ha ensayado la combinación de BTZ con terapia NK-CAR como estrategia anti-MM, esta combinación, de producirse, debe ser secuencial, porque se conoce que BTZ elimina las células NK a altas dosis [91]. Esta aproximación en la que se combinan NK CAR y bortezomib solo se ha llevado a cabo en células NK-92 redirigidas con el CAR anhidrasa IX carbónica en cáncer renal [379].

### 3.7. Senescencia inducida por terapia (TIS) y efectos pro-tumorales inducidos por la reversión del fenotipo senescente

La senescencia es un estado metabólicamente activo de la célula en el que se produce una parada del crecimiento estable y que puede ser inducido por un acortamiento telomérico o por exposición a estrés genotóxico, oxidativo, del retículo endoplásmico u oncogénico, así como por infecciones por patógenos (p.ej. COVID-19) [380] y tratamientos contra el cáncer [381]. Es una respuesta dinámica y heterogénea que contribuye a la prevención de la inestabilidad genómica y la acumulación de daño en el ADN, por lo que constituye un mecanismo fundamental en la supresión de tumores. Se denomina senescencia inducida por tratamiento (TIS) al estado senescente prematuro producido por estrés al exponer las

células a tratamientos administrados frecuentemente en cáncer, como quimioterapia o radiación [382], para prevenir la propagación de las células cancerosas. No obstante, estudios recientes han revelado que este fenómeno no es irreversible en todas las ocasiones, y que, en las células que persisten a largo plazo, la senescencia es un mecanismo adaptativo para inducir resistencia terapéutica, escape de la parada de ciclo, reactivando los procesos de división celular y la potenciación de la agresividad de la célula tumoral, lo que facilita su diseminación y la aparición de recaídas [383]. El estudio diferencial de este estado celular resulta complejo porque no existe un marcador estándar universal y específico de senescencia, si no que se trata de analizar una combinación múltiple de biomarcadores de características no exclusivas en cada neoplasia. Entre los marcadores de senescencia se encuentran ciertos cambios epigenéticos y reprogramación metabólica, así como el aumento de la expresión o activación de los supresores tumorales  $p16^{\text{INK4a}}$ ,  $p53$  y  $p21^{\text{WAF1}}$  [384]; también, se ha reportado un incremento de la actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -galactosidasa a pH ácido [385], resistencia a la apoptosis [386], la disminución del número de células en la fase S del ciclo celular a expensas del incremento en la fase G1 o G2/M [387], concomitante a una disminución en la expresión del marcador de proliferación Ki67, la aparición de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF) (p.ej.  $p$ -H2AX o  $p$ -HP1gamma) y la de un fenotipo secretor pro-inflamatorio (SASP) [388]. El SASP, o fenotipo secretor asociado a senescencia por sus siglas en inglés, se caracteriza por la secreción de citoquinas y quimiocinas (p.ej. IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , CCL5, etc), factores de crecimiento y proteasas como MMPs o uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA) [389]. La composición cualitativa y cuantitativa del SASP no es siempre la misma, depende de los fármacos inductores de la senescencia, del tipo celular y del tiempo desde que se inició la senescencia, lo que va a condicionar su papel anti o pro-tumoral [390]. La ruta más importante de señalización que controla la producción del SASP es la de NF- $\kappa$ B [391] a través de una señalización DDR persistente [392], mediada por la activación de señalizadores de daño, como ATM [393]. No obstante, NF- $\kappa$ B también puede activarse a través de p38MAPK, independientemente del DDR [391]. La producción de SASP durante la senescencia puede también tener lugar a través de la activación de otras vías de señalización como la ruta de Notch [394], JAK-STAT [395], STING [396], IL-6 [397] y mTOR [398], fundamentalmente. Tras inducirse un estrés genotóxico en la célula, la decisión entre entrar en apoptosis o, por el contrario, inducir la senescencia, depende en parte de la magnitud del estrés a la que haya sido expuesta. Bajos niveles de daño pueden desencadenar una respuesta anti-proliferativa



asociada a senescencia sin activar la cascada de señalización de las caspasas que producen la apoptosis de la célula [399].

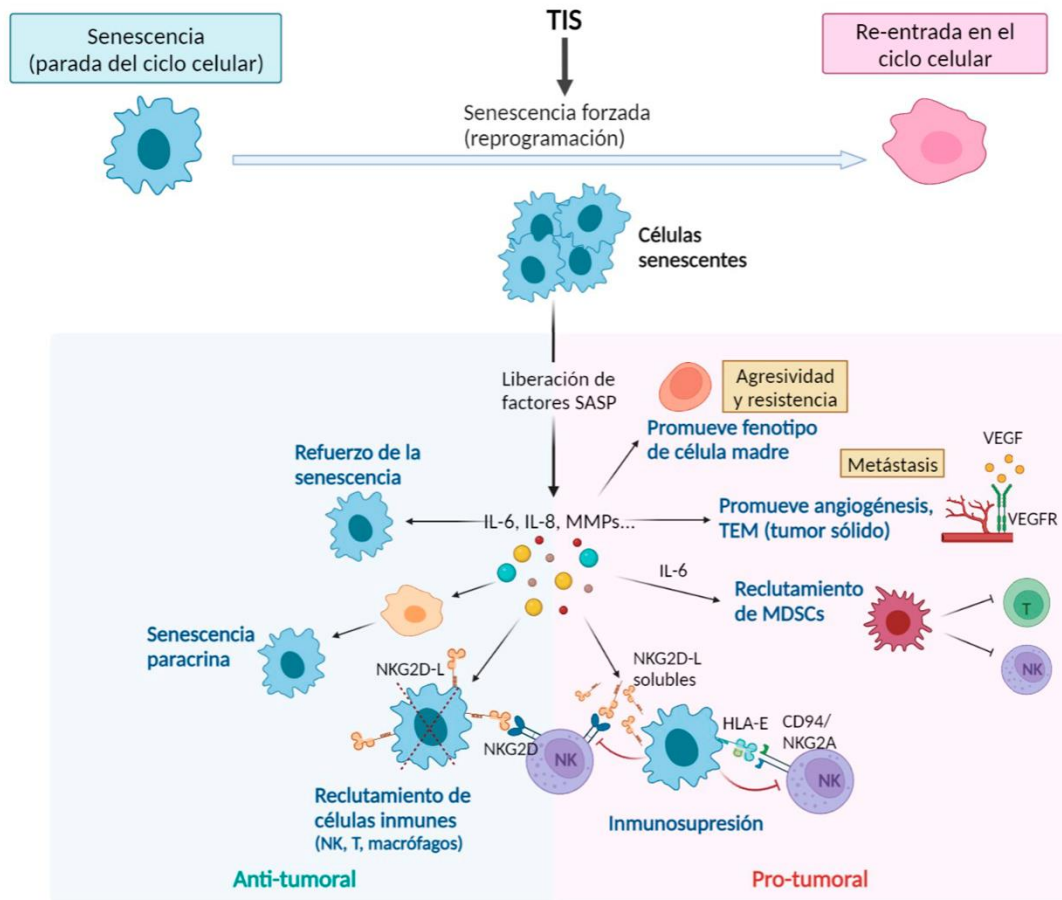
En lo concerniente al papel de la senescencia como supresor tumoral, hay numerosos tratamientos farmacológicos y otras terapias que pueden inducir TIS *in vitro* e *in vivo*, donde la mayoría de ellos actúan directa o indirectamente produciendo daño en el ADN. La lista de fármacos de esta clase es amplia y se sigue expandiendo: inhibidores de topoisomerasa, agentes entrecruzantes del ADN, disruptores de microtubulos o inhibidores de la síntesis de ADN, como, por ejemplo, doxorubicina, etopósido, cisplatino, melfalán, paclitaxel, ciclofosfamida, gemcitabina y metotrexato, entre otros [400]. Es relevante destacar que existe una gradación en la inducción de TIS cuando se utilizan dosis equitóxicas de estas familias de fármacos, por ejemplo, la doxorubicina y el cisplatino, inducen más TIS que el etopósido o la radiación y estos, a su vez, mayor senescencia que los disruptores moleculares docetaxel o vincristina, que producen daño masivo en el ADN por catástrofe mitótica [401]. En tumores hematológicos, se ha demostrado que el tratamiento de las células de MM RPMI-8226 con el fármaco doxorubicina produce una parada del ciclo celular en la fase G2/M, actividad  $\beta$ -galactosidasa detectable y un aumento en la fosforilación de H2AX, ATM, p53 y Chk2 en las células de MM, así como ausencia de apoptosis [402]. De forma similar, el tratamiento de células de eritroleucemia con hidroxiurea [403] o el tratamiento de células de LMA con citarabina [404] han demostrado ser capaces de inducir TIS. Otros mecanismos de acción que se están explorando para inducir TIS independientes del estrés genotóxico son los inducidos por los inhibidores de PTEN (p.ej. VO-OH), disruptores de la interacción HDM2-p53 (p.ej. nutlina-3), moduladores epigenéticos (p.ej. decitabina o vorinostat), inhibidores de CDK4/6 (p.ej. palbociclib) o inhibidores de Aurora-quinasas (p.ej. alisertib). En general, la TIS en células tumorales requiere de la activación de las rutas de p16<sup>INK4a</sup> y p53/p21<sup>WAF1/cip1</sup>, pero es importante destacar, en este sentido, que muchos de estos tratamientos pueden inducir TIS incluso en ausencia de niveles de los principales inhibidores de ciclo dependientes de ciclina como p53, p21<sup>WAF1/cip1</sup> o p16<sup>INK4a</sup> [405-407]. Estudios previos en células de próstata y uroteliales han mostrado que la inducción en la expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> parece más importante asociada a la parada de ciclo celular durante la senescencia temprana, mientras que p16<sup>Ink4a</sup> sería más importante para el mantenimiento del fenotipo senescente [408]. No obstante, la expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> presenta un papel dual, porque su expresión prolongada tras la inducción de

senescencia puede producir un escape y reentrada en la replicación de la célula, incrementando su agresividad [409]. La liberación de factores SASP tras la TIS puede reforzar la senescencia de las células tumorales de una forma autocrina o influenciar de forma paracrina otras células adyacentes tumorales, inhibiendo su proliferación o generar un ambiente inflamatorio que favorece el contexto vascular para la acción de fármacos y la infiltración de células del sistema inmune. El SASP permite la eliminación de las células senescentes a través del sistema inmune reclutando células NK, T CD4<sup>+</sup>, macrófagos y neutrófilos [410]. La célula NK es reclutada por la quimiocina CCL2 producida por el tumor y, en este contexto, es el efector más importante para eliminar células senescentes mediante el reconocimiento directo de los NKG2D-L estimuladores, a través del receptor NKG2D. De hecho, se ha demostrado en fibroblastos senescentes y células estrelladas hepáticas tratadas con etopósido, un aumento en la expresión de NKG2D-L MICA y ULBP2 [411], a través de la actividad ERK, lo que permite su reconocimiento y eliminación por las células NK [390]. La TIS es también capaz de activar p53 en las células de cáncer de mama y colon in vivo, incrementando la expresión de ULBP2 [412] o en un modelo de cáncer hepático donde favorece su aclaramiento por células NK in vivo [413]. En MM, la TIS producida por bajas dosis de doxorubicina y melfalán induce la sobreexpresión de NKG2D-L, MIC A/B y PVR, por lo que las células mielomatosas se vuelven inmunogénicas y se sensibilizan a la actividad citotóxica NK [414]. Por tanto, inducir senescencia en células tumorales puede modular su vulnerabilidad, potenciando su eliminación por parte de las células inmunes efectoras [415] (Fig. 15).

Por otro lado, a pesar de su función supresora del crecimiento tumoral, la TIS puede inducir la reversibilidad del fenotipo senescente, desempeñando un papel pro-tumoral en diferentes cánceres [389, 416, 417]. El SASP puede actuar con una función dual porque ejerce un efecto perjudicial que incluye una respuesta crónica inflamatoria acumulativa que genera un microambiente inmunosupresor permisivo, estimula la proliferación de las células tumorales circundantes no tumorales, por lo que promueve la recaída y progresión del tumor [418]. El SASP, por ejemplo, potencia la neovascularización del tumor de manera directa o indirecta, reclutando macrófagos y estimulándolos hacia el fenotipo inmunosupresor M2 [389]. Más aun, las células senescentes pueden favorecer la inmunoevasión a través de una supresión paracrina del receptor NKG2D y del corte de los NKG2D-L, porque las células senescentes liberan MMPs que llevan a cabo la

liberación de los NKG2D-L solubles que actúan como un señuelo. De hecho, algunos fármacos quimioterápicos, como mitoxantrona, pueden también promover el corte de los NKG2D-L [419] en las células senescentes. El SASP, fundamentalmente la acción de IL-6 regulada vía p38, produce un incremento en la expresión de HLA-E en las células senescentes, suprimiendo la respuesta de los efectores inmunes, como consecuencia de la interacción de HLA-E con el receptor inhibitor NKG2A presente en las células NK y células T CD8<sup>+</sup> [280]. La secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-8 también puede estimular la transición epitelio-mesénquima en tumores sólidos [420] y entre los factores SASP se secretan, entre otros, el factor de crecimiento VEGF que estimula la angiogénesis, lo que facilita la migración y el proceso metastásico [421]. Paradójicamente, se ha reportado que las células tumorales pueden adquirir propiedades de célula madre [416], que contribuye a la resistencia a quimioterapia [422], a la metástasis y promueve la regeneración del tejido [423] (Fig. 15).

Con el fin de evitar los efectos perjudiciales descritos causados por el ambiente inflamatorio crónico inducido por la acumulación de células senescentes, recientemente, han emergido distintas estrategias de letalidad sintética en combinación para el tratamiento del cáncer, basadas en un tratamiento secuencial de las células a las que se ha inducido la senescencia con senoterapéuticos senomórficos (moléculas pequeñas que suprimen parcialmente el fenotipo secretor SASP), como por ejemplo, la rapamicina que inhibe la activación de NF- $\kappa$ B [424] o senolíticos, que permiten la reducción de la secreción de las citoquinas, quimiocinas y proteasas asociadas a senescencia para reducir la invasividad del tumor. Otro ejemplo de este grupo es anakinra, un antagonista del receptor de la IL-1 [425], que consigue bloquear la producción de IL-6 e IL-8 en las células senescentes tumorales. También se han desarrollado estrategias mediante la administración de terapias senolíticas (pequeñas moléculas que inducen la muerte selectiva de las células senescentes) [426, 427], como quercetina [428], dasatinib [429] o navitoclax [430]. Cabe resaltar, en este sentido, una estrategia única y novedosa, que es la generación, por primera vez, de células T-CAR senolíticas dirigidas frente a uPAR como diana (receptor de la uroquinasa activadora de plasminógeno). El receptor uPAR exhibe altos niveles de expresión en las células senescentes. Las células CAR T anti-uPAR han demostrado eficacia en la eliminación de células senescentes en un modelo de patología asociada a senescencia, como la fibrosis hepática y contra células con TIS en adenocarcinoma de pulmón [431].



**Figura 15. Funciones asociadas al fenotipo senescente SASP.**

Las células senescentes liberan citoquinas y otras proteínas que promueven, por un lado, la parada del crecimiento tumoral y favorecen la eliminación de las células senescentes por parte de efectores del sistema inmune. Por otro lado, las células senescentes pueden generar un ambiente inmunosupresor pro-tumoral y promover la angiogénesis, proliferación tumoral y resistencia. TIS, senescencia inducida por tratamiento; MMPs, metaloproteinasas de la matriz; IL-, interleuquina; NKG2D-L, NKG2D ligandos; MDSCs, células madre derivadas de células mieloides; TEM, transición epitelio-mesénquima. Adaptada de Cancer Manag Res. 2020;12:13553-13566. [410]



# **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de los avances en el tratamiento del mieloma múltiple, los pacientes con MM/RR penta-refractarios presentan una supervivencia media global de 5,6 meses, por lo que el MM sigue considerándose una enfermedad incurable. En MM las células del sistema inmune están inmunosuprimidas por factores extrínsecos asociados al microambiente tumoral o intrínsecos al tumor, sobre todo en etapas avanzadas de la enfermedad. Por tanto, el uso de una plataforma de células NK CAR alogénicas funcionales que expresan CAR clínicamente relevantes, como NKG2D y BCMA, podría ser una estrategia óptima en este contexto para superar la inmunosupresión de las células NK, ya que se trata de un producto celular homogéneo, seguro, rápido de obtener y a menor coste que otras inmunoterapias, como las T-CAR.

La preclínica con células autólogas NK CAR NKG2D en nuestro laboratorio ha mostrado eficacia, sin embargo, ensayos clínicos con células T-CAR NKG2D exhiben falta de eficacia debido a la persistencia limitada de esta inmunoterapia en los pacientes, asociada a la baja expresión de los ligandos diana en las células de MM/RR. Este escenario justifica la búsqueda de terapias combinadas con el CAR NKG2D para aumentar la inmunogenicidad de las células de MM/RR.

## HIPÓTESIS

Los efectores inmunes alogénicos NK-92MI y CB-NK transducidos con los CAR NKG2D y BCMA son seguros y eficaces frente a células de MM, y su potencial citolítico es superior al de estas células en ausencia de expresión de CAR.

La eficacia del CAR BCMA es superior a la del CAR NKG2D frente a células de MM *in vitro* e *in vivo*.

La expresión de CAR duales NKG2D-BCMA en las células efectoras produce sinergia en la citotoxicidad y cobertura citotóxica frente a los dos CAR NKG2D y BCMA simples.

Es factible potenciar la eficacia del CAR NKG2D en un modelo de resistencia a BTZ e inmunoterapia previa anti-BCMA, mediante la combinación con fármacos de uso actual en el tratamiento de MM, que aumenten la expresión de los ligandos de NKG2D.



### OBJETIVOS

Atendiendo a la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas para los pacientes con MM/RR, los objetivos específicos de esta tesis son:

(1) Investigar una inmunoterapia eficaz para el tratamiento de pacientes de MM/RR con diversas fuentes de células NK alogénicas. Para ello, se han planteado dos objetivos específicos:

- Generar células NK-92MI y CB-NK transducidas con los CAR NKG2D y BCMA.

- Comparar la eficacia de ambas inmunoterapias NK-CAR alogénicas y su combinación sobre células de MM in vitro e in vivo.

(2) Potenciar la eficacia de la terapia NKG2D CAR con el efector inmune más eficaz obtenido en la comparación anterior, en el contexto de resistencia a BTZ y recaída tras las terapias anti-BCMA. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Encontrar combinaciones con BTZ que puedan aumentar la sensibilización de las células de MM a las células NK CAR en un contexto resistente, para incrementar las respuestas a largo plazo de este CAR in vivo.

- Estudiar los mecanismos que incrementan la inmunogenicidad a través de la expresión de ligandos de estrés en las células de MM, por los que se vuelven vulnerables a los tratamientos con los efectores inmunes NK CAR estudiados.

# 4. MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. CULTIVOS CELULARES Y MUESTRAS PRIMARIAS

### 1.1. Líneas celulares

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las líneas celulares de MM: U266B1 (ACC 9), NCI-H929 (ACC 163) y RPMI-8226 (ACC 402) adquiridas desde el repositorio celular DSMZ (Liebniz institute, Alemania); la línea celular XG-1 (CVCL\_4797), cedida por la Dr. Shelly Lawson de la universidad de Sheffield (Reino Unido); la línea celular ARP1 (CVCL\_D523), cedida por el Dr. Joshua Epstein (Arkansas Cancer Research Center, Arkansas, EEUU); y las líneas celulares resistentes a bortezomib NCI-H929 R20 y RPMI-8226 R7, cedidas por el Dr. Joaquín Teixidó (Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid) [432]. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 2 mM L-glutamina, 10% suero fetal bovino (FBS) (Hyclone) y 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) (Lonza) y se mantuvieron en ambiente húmedo a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento de la línea celular XG-1 se adicionó al medio de cultivo interleuquina-6 humana recombinante (rhIL-6) a 1 ng/ml (Miltenyi).

La línea celular NK-92 (CRL-2407) y la línea celular NK-92MI (CRL-2408), generada por expresión ectópica de la IL-2 humana en la línea celular de linfoma NK NK-92 (Tam et al. 1999), se adquirieron del repositorio celular ATCC (American Type Culture Collection). La línea celular NK-92 se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con 2mM L-glutamina, 10% de FBS, 10% suero de caballo, aminoácidos no esenciales (Cytiva), 1 mM sodio piruvato (Cytiva), 100UI/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) (Lonza) y 200 UI/ml de rhIL-2 (Miltenyi). La línea celular NK-92MI se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con 2mM L-glutamina, 10% de FBS, 100UI/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) (Lonza) y 100 UI/ml de interleuquina-2 humana recombinante (rhIL-2) (Miltenyi) para acelerar su expansión in vitro.

La línea celular de eritroleucemia cromosoma Philadelphia<sup>+</sup> K562 (ACC 10) se adquirió desde el repositorio celular DSMZ (Liebniz institute, Alemania), mientras que la línea celular K562-mb21-41BBL (CSTX002) fue cedida por el Dr. Dean Lee (Nation Wide Children, Ohio, EEUU). Esta línea celular ha sido modificada para expresar de manera constitutiva en la membrana plasmática la interleuquina-21 y el ligando de 41BB (41BB-L o CD137-L), así como CD64, CD86 y CD19 truncado [433]. La interacción de la

interleuquina-21 de membrana y el 41BB-L con sus respectivos receptores expresados en las células NK estimula su activación y proliferación.

La línea celular empaquetadora HEK293T (ACC 875), adquirida desde el repositorio celular DSMZ, fue utilizada para la producción de vectores lentivirales. Es una línea embrionaria humana de epitelio de riñón, modificada con la inserción del antígeno SV40 T. Esta línea celular se cultivó en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Lonza) suplementado con 10% FBS (Hyclone) y 100 UI/ml de P/S (Lonza).

El recuento del número de células en todos los casos se realizó mediante contaje en cámara de Neubauer por exclusión con azul de tripán 0,4% (Gibco).

Periódicamente, se analizaron todas las líneas celulares para corroborar la ausencia de especies de micoplasma, y la integridad de todas las líneas celulares fue testada en la unidad de genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) mediante análisis de repeticiones cortas en tándem del ADN (STR).

## 1.2. Muestras de pacientes y donantes sanos

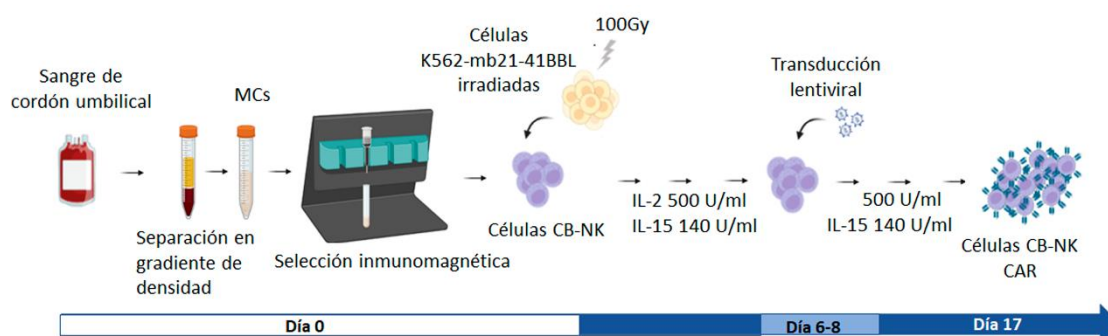
Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de sangre de cordón umbilical de donantes sanos obtenidas del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid y del hospital 12 de octubre (H12O). También se utilizaron muestras de médula ósea (MO) de pacientes con MM del H12O, tanto de nuevo diagnóstico como en recaída, así como muestras de sangre periférica de donantes sanos del H12O. El estudio (nº 20/326) con muestras de donantes sanos o de pacientes con MM fue aprobado por el Comité Ético del H12O acorde a la declaración de Helsinki. Tanto los donantes sanos como los pacientes con MM (n=9) proporcionaron el consentimiento informado antes de la participación en este estudio. Todos los análisis realizados con muestras primarias se llevaron a cabo de manera aleatoria, según secuencia de extracción en el hospital (n=9).

## 2. AISLAMIENTO, CULTIVO, EXPANSIÓN Y TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS NK Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS DE MM

### 2.1. Obtención y cultivo de células NK a partir de sangre de cordón umbilical (CB-NK)

Para la obtención de células CB-NK se partió de células mononucleadas de sangre periférica de cordón umbilical (CB) aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich) y posterior lisis de eritrocitos con buffer con amoníaco-cloruro-potasio (ACK) (Gibco). A continuación, se purificó la población NK presente en la muestra mediante selección negativa inmunomagnética utilizando el kit de aislamiento de células NK (Miltenyi) y se analizó la pureza obtenida mediante citometría de flujo (CMF). Las células CB-NK purificadas se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio TexMACS (Miltenyi) suplementado con 10% de suero humano AB (Sigma) y 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) (Lonza) en presencia de IL-2 a 500 UI/ml e IL-15 a 140 UI/ml (Miltenyi). Las células CB-NK se cultivaron con la línea celular K562-mb21-41BBL, previamente irradiada a 100Gy, a ratio 1:1,5 (NK: K562-mb21-41BBL). El medio de cultivo con las interleuquinas se reemplazó cada 3 días manteniendo el cultivo de células CB-NK a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, hasta un tiempo máximo de expansión de 17 días.

Todas las muestras fueron analizadas y mostraron un resultado negativo para VIH, sífilis, hepatitis B y C mediante test rápidos (Healgen, Intermedical, Laboquick y Ovios, respectivamente).

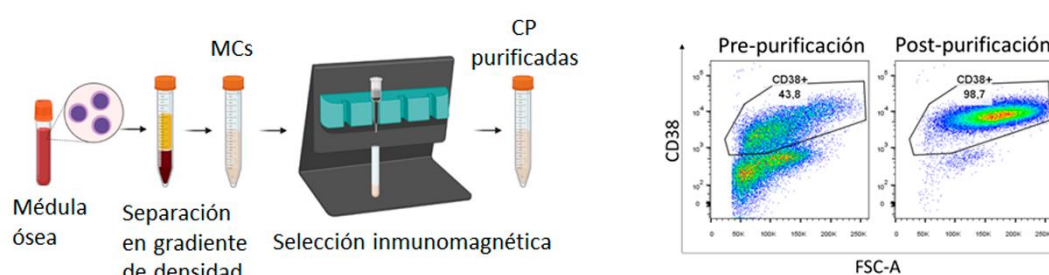


**Figura 16. Protocolo de obtención y expansión de células CB-NK CAR.**

MCs, células mononucleadas; CB-NK, células NK de sangre de cordón umbilical; IL, interleuquina.

## 2.2. Aislamiento y purificación de células plasmáticas de pacientes de MM

Para la obtención de células plasmáticas primarias de MM se partió de células mononucleadas procedentes de MO de pacientes con MM aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich) y posterior lisis de eritrocitos con buffer ACK (Gibco). A continuación, las células plasmáticas se purificaron utilizando el kit de selección positiva inmunomagnética de células CD138<sup>+</sup> (Miltenyi). La pureza de la muestra se determinó por citometría de flujo mediante el marcaje con el anticuerpo anti-CD38-FITC (Cytognos).



**Figura 17.** Esquema del protocolo de obtención de CP puras a partir de médula ósea de pacientes de MM.

Análisis representativo por citometría de flujo de la pureza obtenida tras la selección inmunomagnética de células plasmáticas de MM (CD138<sup>+</sup>). Tras la purificación, esta población internaliza la molécula de superficie CD138, por lo que su detección mediante citometría de flujo se realiza con el anticuerpo anti-CD38. MCs, células mononucleadas; CP, células plasmáticas.

## 2.3. Diseño de las moléculas CAR

El plásmido de transferencia para la generación del CAR NKG2D 41BBz (41BB-CD3ζ) fue cedido por Daniel J. Powell Jr. (Perelman School of Medicine, Pennsylvania, EEUU). Este CAR en su componente extracelular contiene la secuencia aminoacídica 82-216 del ectodominio del receptor NKG2D humano. Este fue el esqueleto receptor que se utilizó para subclonar las distintas moléculas CAR.

Para la generación del CAR NKG2D CD28ζ se diseñó una secuencia nucleotídica que contenía el coestimulador CD28-CD3z, flanqueada por los sitios de restricción de las enzimas Nde I y Sal I (New England Biolabs). Mediante un clonaje convencional con dichas enzimas de restricción se sustituyó la región de los coestimuladores 41BB-CD3z en el vector original por CD28-CD3z.

De forma similar, el CAR BCMA 41BBz se diseñó y se mandó construir una secuencia que contenía el péptido señal de la cadena ligera  $\kappa$  ( $\kappa$ LC), la scFv anti-BCMA procedente del anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano J22.9-xi (clon 4ZFO, ProteinDataBase), las regiones bisagra y el dominio transmembrana del receptor CD8 $\alpha$ . Esta región fue flanqueada con los sitios de restricción de las enzimas Nhe I y Nde I (New England Biolabs). Mediante un clonaje convencional en un único paso y utilizando el esqueleto receptor del CAR NKG2D se sustituyeron el péptido señal, el ectodominio del receptor NKG2D, la bisagra y el dominio transmembrana del plásmido que codifica para el CAR NKG2D CD28z por la nueva secuencia.

La ligación se realizó utilizando la enzima T4 ADN ligasa (BioLabs) y el producto de ligación se transformó en bacterias *E.coli* químicamente competentes One Shot™ Stbl3™ (ThermoFisher) mediante choque térmico. Posteriormente, las bacterias se sembraron en 2% (p/v) de agar-Luria Bertani esterilizado conteniendo 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente las colonias seleccionadas se sembraron en medio LB líquido en presencia del antibiótico correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación. El ADN plasmídico de las diferentes colonias seleccionadas se extrajo mediante el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Tras analizar el patrón de digestión del ADN aislado de los diferentes clones mediante el corte con varias enzimas de restricción, se seleccionó un clon de bacterias de cada clonaje, se sembró en 300 ml medio LB líquido en presencia del antibiótico correspondiente y al día siguiente, se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit comercial QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Se comprobó de nuevo el patrón de digestión del ADN plasmídico y posteriormente se encargó su secuenciación por el método Sanger a la empresa de secuenciación Stab Vida.

Todas las secuencias se diseñaron utilizando el software SnapGene™ y se mandaron sintetizar a la empresa de clonajes GeneArt (ThermoFisher).

#### 2.4. Producción de sobrenadantes lentivirales de 3ª generación

Para la producción de sobrenadantes virales autoinactivados de tercera generación se emplearon las células empaquetadoras HEK293T, por su alta capacidad de transfección debido a la presencia del antígeno T del SV40 (virus simio 40). Se sembraron  $9 \times 10^6$  células en cada placa P150 tratada con gas (ThermoFisher Scientific) y se llevó a cabo la



transfección utilizando 2,5M CaCl<sub>2</sub> (Sigma), 2X HBS (281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,12, filtrado 0,22µm), 0,1X buffer TE (10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8) dilución 1:10 con agua destilada y esterilizada y filtrada 0,22 µm) y dH<sub>2</sub>O. Dos días después se llevó a cabo la recogida de sobrenadantes, previo filtrado del medio de cultivo (0,45µm) para eliminar los restos celulares. El sobrenadante filtrado se clarificó mediante ultracentrifugación a 20 000 rpm durante 2h a 20°C. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en medio RPMI-1640. Tras la homogenización en agitador durante 30 minutos, se alicuotaron las partículas lentivirales y se conservaron a -80°C.

Los plásmidos utilizados en el laboratorio para la producción de vectores lentivirales de 3<sup>a</sup> generación fueron cuatro: pMD2.VSV.G (envuelta viral; PlasmidFactory), pMDLg/pRRE (plásmido de expresión Gag/Pol de VIH-1; PlasmidFactory), pRSV-Rev 10 (transactivador; PlasmidFactory), pAdvantage™ (plásmido que aumenta la iniciación de la transducción, Promega Biotech) y el plásmido de transferencia correspondiente en cada caso. Para el vector lentiviral del CAR de NKG2D, NKG2D-4-1BB-CD3z, el plásmido de transferencia utilizado fue pTRPE\_NKG2D-ECD\_4-1BBz. Para el BCMA CAR, BCMA-41BB-CD3z, el plásmido utilizado fue pTRPE\_BCMA\_4-1BBz. Para la expresión de luciferasa de luciérnaga y la GFP (ffLucGFP) se utilizó el plásmido PRRL\_Luc\_EGFP.

### 2.5. Producción de sobrenadantes gamma-retrovirales

La producción de sobrenadantes gamma-retrovirales se realizó empleando en este caso el plásmido *helper* pMLVg/p y el plásmido de la envuelta pMD2.VSV.G. Como plásmido de transferencia se utilizó el plásmido iCasp9-ΔCD19 cedido por el Dr. Malcolm Brenner (Baylor College of Medicine, Texas, EEUU), que codifica para el interruptor pro-apoptótico o suicida caspasa 9 inducible (iCasp9) y el antígeno CD19 truncado (ΔCD19) [434]. Con el fin de obtener unas células empaquetadoras con producción retroviral estable y de elevado título, se llevó a cabo una estrategia “ping-pong” o de cambio de pseudotipo para lo que se transdujeron, con las partículas retrovirales liberadas por las HEK293T, las células empaquetadoras FLY-RD18 [435], que producen partículas retrovirales con la envuelta felina RD114. Para conseguir un cultivo de células FLY-RD18 de alta pureza, a los 10 días de la transducción se seleccionaron por separación celular mediante citometría de flujo las células CD19<sup>+</sup> en el citómetro de flujo FACSaria

Fusion (BDBiosciences). El sobrenadante producido por las células FLY-RD18 seleccionadas se alicuotó, se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se utilizó posteriormente para transducir las células de interés.

## 2.6. Titulación de sobrenadantes lentivirales

Para la titulación de los sobrenadantes lentivirales se sembraron  $2 \times 10^5$  células HEK293T por pocillo en placas P6 tratadas con gas (ThermoFisher Scientific) y se añadió el volumen correspondiente de sobrenadante, haciendo diluciones seriadas. Siete días después, se recogieron las células y se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células transducidas con cada una de las diluciones del lentivector empleado. La transducción se detectó con la proteína recombinante o anticuerpos correspondientes en cada caso, especificados en la *Tabla 5*. Teniendo en cuenta el número de células que se había sembrado inicialmente y asumiendo que cada célula transducida ha sido infectada por una sola copia del vector, se determinó el título del lentivector, expresado en partículas virales por mililitro (pv/ml), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título (pv/ml)} = N^{\circ} \text{ cél} \times \% \text{ CAR}^+ \times \text{Dilución}/100.$$

## 2.7. Transducción lentiviral

Las poblaciones efectoras NK se sembraron a una concentración de entre 0,8 y  $1,33 \times 10^6$  células/ml en placas de fondo plano (Corning) previamente tratadas con  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de retronectina (Takara) y se transdujeron con los sobrenadantes que contienen los lentivectores de interés a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Para favorecer la entrada del virus en la célula se llevó a cabo la transducción con un único ciclo de centrifugación (2000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente) y finalmente se incubó la placa a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Tras 24 horas, se retiraron los restos del virus con un lavado con PBS (Lonza) y se sembraron las células en su medio de cultivo y citoquinas correspondientes (Ver apartado *1.1 Líneas celulares* y *2.1. Obtención y cultivo de células NK a partir de sangre de cordón umbilical (CB-NK)*). La eficacia de transducción en las células se analizó a los 7 días por citometría de flujo.

## 2.8. Transducción gamma-retroviral

Para la transducción de las células con sobrenadantes gamma-retrovirales se utilizaron placas de fondo plano previamente tratadas con  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de retronectina (Takara). Se precargaron los pocillos con sobrenadante gamma-retroviral durante 24h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante, se sembraron las células resuspendidas en sobrenadante gamma-retroviral y se completó el pocillo con el medio de cultivo correspondiente para obtener una concentración final de  $0,8 \times 10^6$  células/ml. Para favorecer la entrada del virus en la célula, se llevó a cabo la transducción con un único ciclo de centrifugación en centrífuga (2.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente) y finalmente se incubó la placa a  $37^\circ\text{C}$ .

Tras 24 horas, se retiró el virus mediante un lavado con PBS y se sembraron las células en el medio de cultivo y citoquinas correspondientes (Ver apartado *1.1. Líneas celulares*). La eficacia de transducción de las células se midió a los 7 días por citometría de flujo.

## 3. ANÁLISIS POR q-PCR DEL NÚMERO DE COPIAS DEL VECTOR (VCN) POR CÉLULA

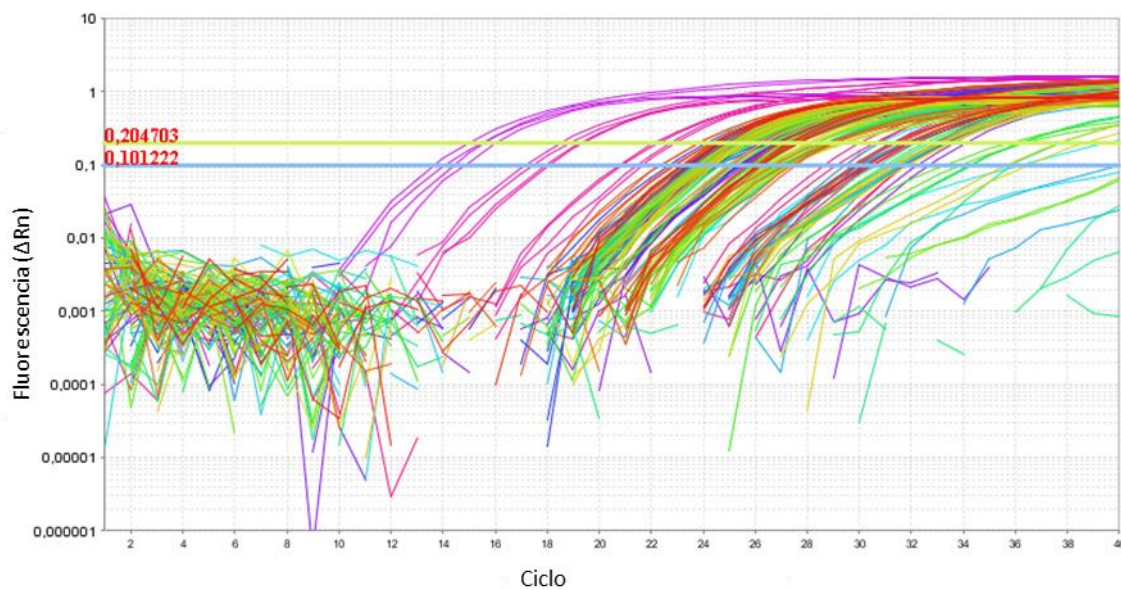
Una semana después de la transducción de las poblaciones efectoras, se extrajo el ADN de las células mediante el kit DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) y se cuantificó el número de copias del vector (VCN) por célula mediante q-PCR, utilizando el equipo Applied 7500 Fast Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se detectó la secuencia Psi (empaquetadora) junto con el gen de la albúmina humana, empleando los siguientes cebadores:

- Psi directo (Psi.F): 5'CAGGACTCGGCTTGCTGAAG3'
- Psi reverso (Psi.R): 5'TCCCCCGCTTAATACTGACG3'
- Alb directo (Alb.F): 5'GCTGTCATCTCTTGTGGGCTG3'
- Alb reverso (Alb.R): 5'ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC 3'

La amplificación de la albúmina se detectó mediante una sonda hibridada al fluoróforo VIC™ y la amplificación de Psi con otra sonda hibridada al fluoróforo FAM™.

Cada muestra se analizó por triplicado y se cuantificó el genoma viral interpolando los valores de Ct (umbral de ciclo) de las muestras al valor Ct de una curva estándar con diluciones seriadas, de una concentración conocida de un fragmento de ADN de doble

cadena que contiene tanto la región Psi como la región de albúmina reconocida por los cebadores.

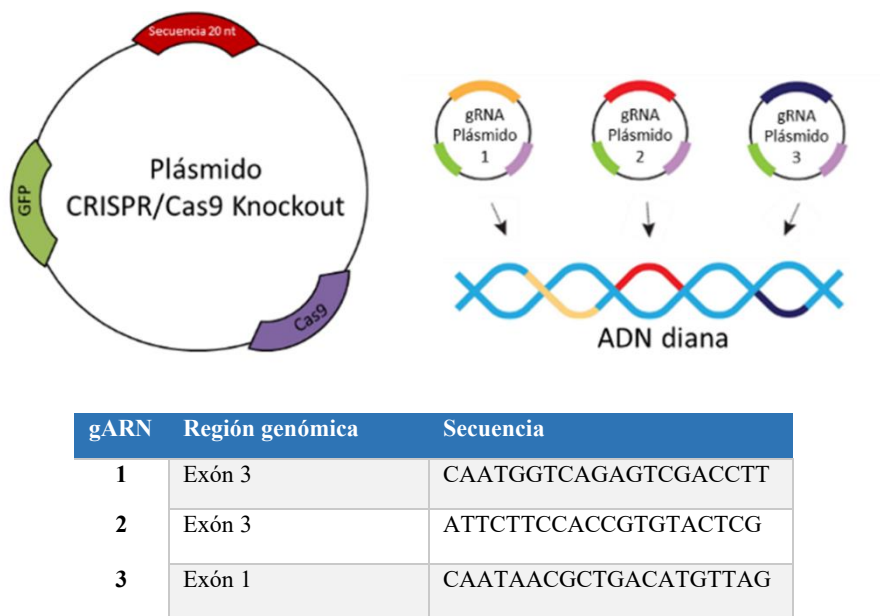


**Figura 18.** Análisis representativo de la curva de amplificación de la secuencia psi en muestras de líneas celulares NK-92 y células NK primarias.

#### 4. SUPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BCMA MEDIANTE EDICIÓN GENÓMICA

Para suprimir la expresión de BCMA en distintas líneas celulares de MM se utilizó el sistema BCMA CRISPR/Cas9 *Knockout* (Santa Cruz), que consiste en un conjunto de tres plásmidos. Cada plásmido contiene una secuencia diferente de ARN guía (gARN) de 20 nucleótidos de reconocimiento específico para BCMA, así como la secuencia codificante de la ribonucleasa *S. pyogenes* Cas 9 unida por el péptido 2A a la de la proteína verde fluorescente (GFP). Las secuencias del gARN son las encargadas de dirigir a la proteína Cas9 para producir la rotura de la doble cadena en el ADN genómico en los sitios específicos. Para la transfección de las líneas celulares U266 y ARP-1 se utilizaron  $90 \times 10^6$  células y 75  $\mu\text{g}$  del conjunto de plásmidos BCMA CRISPR/Cas9 “Knockout”. Se transfectaron las células mediante electroporación a 250 V, 950  $\mu\text{F}$  y resistencia  $\infty$  en el equipo Gene Pulser X cell (BioRad). Tras 48 h, se seleccionaron las células GFP<sup>+</sup> mediante citometría de flujo en el separador celular FACS Aria Fusion (BDBiosciences). Las células seleccionadas se mantuvieron en cultivo durante una semana antes de analizar

por citometría de flujo la expresión de BCMA. Mediante este sistema de edición génica, se generaron las líneas celulares U266 BCMA<sup>KO</sup> y ARP1 BCMA<sup>KO</sup>.



**Figura 19.** Supresión de la expresión de BCMA mediante edición génica utilizando el sistema BCMA CRISPR/Cas9 *Knockout*.

## 5. CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF)

Para caracterizar el perfil de receptores de superficie de las células NK en estado basal y durante la expansión, así como los distintos marcadores en líneas celulares y células primarias se utilizó un citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences) equipado con 3 láseres: un diodo láser de estado sólido de 405 nm (violeta), un láser de estado sólido de 488 nm (azul) y un láser helio-neón de 633 nm (rojo), y con capacidad de detección de 8 rangos de fluorescencia distintos y el software FACSDiva v.8.0.1. Los anticuerpos utilizados se encuentran detallados en la *Tabla 5*.

En cada marcaje de citometría se analizó un mínimo de 20.000 células de la población de interés. Se utilizaron 100 000 células por marcaje y se lavaron con PBS mediante centrifugación durante 5 min a 1500 rpm. Posteriormente, se retiró el PBS del lavado y se reemplazó por PBS que contenía la combinación de anticuerpos correspondiente (*Tabla 5*). Se realizó una incubación durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Pasado ese tiempo, se lavaron las células con PBS, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm y, finalmente,

se resuspendieron en PBS con 0,2 µg/ml 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

Se utilizaron controles sin tinción y tinción simple para ajustar compensaciones y determinar eventos positivos y negativos, así como el control denominado fluorescencia menos uno (*fluorescence minus one*, FMO), que incluye todos los fluoróforos excepto el que es objeto de estudio. En la estrategia de análisis se excluyeron los dobletes y células no viables (DAPI<sup>+</sup>) antes de determinar la población de interés. El análisis de los datos se realizó con el programa informático FlowJo Vx 10.0.07 (BD Biosciences).

Antígeno	Clon	Fluorocromo	Procedencia	Referencia
CD3	UCHT1	PE/Cy7	Biolegend	300420
CD16	3G8	APC/Cy7	Biolegend	302018
CD19	SJ25C1	APC/Cy7	Biolegend	363010
CD45	2D1	PerCP/Cy5,5	Biolegend	368504
CD56 (NCAM)	HCD56	APC	Biolegend	318310
NKG2A (CD159a)	Z199	PE	Beckman Coulter	IM3291U
NKG2C	134591	Alexa Fluor 488	R&D Systems	FAB138G-100
NKG2D (CD314)	149810	PE	R&D Systems	FAB139P
BCMA (CD269)	19F2	PE	Biolegend	357504
rBCMA (CD269)	ANC3B1	-	Adipogen	ANC-519-030
Estreptavidina	-	PE	BD Pharmingen	554061
Yoduro de propidio	-	PE	Sigma Aldrich	P4864
DAPI	-	-	Sigma Aldrich	D9542
AnexinaV		APC	Biolegend	640941
ULBP2	MM0593-7F33	-	Abcam	ab89930
ULBP2/5/6	165903	PE	R&D Systems	FAB1298P
ULBP1	170818	PE	R&D Systems	FAB1380P
ULBP3	166510	PE	R&D Systems	FAB1517P
MICA	159227	PE	R&D Systems	MAB1300
MICA/B	6D4	PE	Biolegend	320906
CD138	MI15	PE/Cy7	Biolegend	356514
CD38	LD38	FITC	Cytognos	CYT-38F
IFNY	45-15	PE	Miltenyi Biotec	130-113-493
Golgistop	51-2092KZ	-	BD Biosciences	554724
IgG1, κ	MOPC-21	PE	BD Pharmingen	555749
IgG2a, κ	MOPC-173	PE	Biolegend	400211
Ki67	Ki-67	Brilliant Violet 421™	Biolegend	350506
anti-IgG conejo	-	Alexa Fluor™ 594	Invitrogen	A-11005
BML-277	-	-	MedChemExpress	HY-13946

**Tabla 5. Reactivos y anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la caracterización celular por citometría de flujo.**

Isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina cianina 5.5 (PerCP/Cy5.5), ficoeritrina/cianina 7 (PE/Cy7), aloficocianina (APC) y aloficocianina/cianina 7 (APC/Cy7).

### 5.1. Caracterización de las poblaciones: inmunofenotipo

Se estudió el inmunofenotipo de todas las líneas celulares de MM, así como el de las células plasmáticas purificadas de pacientes de MM mediante los niveles de expresión de los marcadores CD38, CD138, CD56, CD45, CD19, de los ligandos de NKG2D (ULBP1, ULBP3, ULBP2/5/6, MICA/B) y de BCMA. Para el estudio del inmunofenotipo de las células efectoras CB-NK se utilizaron los anticuerpos dirigidos contra CD56, CD16 y CD3.

Para medir el porcentaje de transducción de las distintas poblaciones efectoras CAR se empleó el anticuerpo anti-NKG2D-PE o la proteína recombinante humana BCMA conjugada a biotina (Adipogen) seguida por un marcaje con estreptavidina-PE (BD Pharmingen).

### 5.2. Cuantificación de citoquinas solubles y proteínas citotóxicas liberadas al sobrenadante

El ensayo de liberación de citoquinas se llevó a cabo mediante el cocultivo de  $5 \times 10^4$  células efectoras y diana a ratio 1:1 en el medio correspondiente sin interleuquinas. Tras 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de citoquinas y proteínas citotóxicas mediante el ensayo multiplexado basado en las esferas LEGENDplex™ Human CD8/NK y uno personalizado (BioLegend), realizado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los archivos se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences) utilizando el software LEGENDplex™ *Data Analysis Software Suite*.

### 5.3. Análisis del ciclo celular

Se recogieron  $1 \times 10^6$  células, previamente lavadas con PBS mediante centrifugación. El precipitado celular se resuspendió en PBS y se fijaron las células con etanol al 70% frío, lentamente y agitando. Las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , un mínimo de 12h.

Antes del análisis por CMF, se realizaron dos ciclos de lavado con PBS y centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Más tarde, se resuspendió el precipitado celular en una solución de PBS que contenía 0,04% yoduro de propidio y 1mg/ml RNAsa A. Finalmente,

las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se analizaron en escala lineal en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences).

#### 5.4. Estudio de apoptosis celular mediante marcaje con anexina-V

Se recolectaron  $0,5 \times 10^6$  células y se lavaron dos veces con PBS frío y centrifugación. El precipitado celular se resuspendió en tampón de unión (BioLegend) que contenía Anexina-V (BioLegend) y se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 15 min.

Antes del análisis por CMF, se añadió una solución de yoduro de propidio 0,05% en tampón de unión (BioLegend). Finalmente, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences).

#### 5.5. Análisis de proliferación celular mediante marcaje con Ki67

Se recogieron  $5 \times 10^5$  células, previamente lavadas con PBS y centrifugación. El precipitado celular se resuspendió en PBS y se añadió etanol frío al 70%, lentamente y agitando. Las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , un mínimo de 12h.

Previo al análisis, se realizaron 3 lavados con solución de marcaje celular comercial de BioLegend, que contiene FBS y acida sódica. Posteriormente, se llevó a cabo el marcaje con el anticuerpo anti-Ki67-BV421 (BioLegend) en la solución de marcaje celular. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, se lavó el marcaje con solución de marcaje celular y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences).

#### 5.6. Estudio del efecto de la inhibición de Chk2 sobre la expresión de NKG2D-L

Para evaluar la implicación de Chk2 en la inducción de NKG2D-L tras el tratamiento farmacológico con BTZ+GSI, se utilizó la línea celular de MM resistente a BTZ NCI R20. Estas células se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24h en presencia del inhibidor de Chk2 BML-277 (MedChemExpress), a una concentración de  $45\mu\text{M}$ . Al día siguiente, se administraron el BTZ 20nM y el GSI  $100\mu\text{M}$  que se mantuvieron durante 24h. Posteriormente, se lavaron las células y se marcaron con los anticuerpos correspondientes



para medir por citometría de flujo la expresión de NKG2D-L, en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences).

## 6. ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD IN VITRO

### 6.1. Ensayo de citotoxicidad frente a células diana de MM

Con el fin de evaluar la capacidad citotóxica de las células efectoras se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en los que se enfrentaron dichas células a líneas celulares o células primarias de MM (células diana) a distintos ratios diana:efector (D:E). Para ello, se incubaron las células diana con 3  $\mu$ M Calcein-acetoxymethylester, calceína-AM (Sigma-Aldrich) en medio RPMI-1640 con 100 UI/ml de P/S, sin suplementar, durante 30 minutos a 37°C. La calceína-AM actúa como una sonda no fluorescente que penetra en la célula y tras la hidrólisis del acetoximetil éster por parte de las esterasas intracelulares se convierte en calceína, una forma aniónica fluorescente de excitación y emisión a 488nm/520nm.

Tras la incubación, las células marcadas se lavaron y se cocultivaron con las células efectoras, a las que se le retiró la IL-2 24h antes del cultivo. Se incluyeron también células diana marcadas en solitario (lisis basal) y células diana marcadas tratadas con 1% Tritón X-100 (Sigma Aldrich) (lisis máxima). Después de sembrarlas en el medio de cultivo, las células se centrifugaron a 1200 rpm 5 minutos para favorecer la interacción entre las células diana y efectoras. El cocultivo se mantuvo durante 3 horas a 37°C y, pasado este tiempo, se volvió a centrifugar la placa y se recogió el sobrenadante. La fluorescencia emitida por la calceína liberada al sobrenadante, ya sea por lisis espontánea o por la lisis producida por la célula efectora, se midió en el espectrofotómetro VICTOR Nivo™ (PerkinElmer). El porcentaje de lisis específica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$100 \times \frac{\text{Fluorescencia cocultivo} - \text{Fluorescencia lisis basal}}{\text{Fluorescencia lisis máxima} - \text{Fluorescencia lisis basal}}$$

Se evaluó la implicación de distintas moléculas solubles o anticuerpos sobre la actividad citotóxica de las células efectoras NK. Para ello, se incubaron las células NK con 10  $\mu$ g/ml del anticuerpo bloqueante anti-NKG2D (R&DSystem) o su isotipo correspondiente IgG1k, o con las proteínas solubles de MICA (sMICA) (ProSpec) a 5ng/ml o 1000 ng/ml o de BCMA (sBCMA) (Adipogen) a 500 ng/ml durante 30 minutos a 37°C. En el caso

del anticuerpo anti-NKG2D, tras el bloqueo, se realizó un lavado de las células NK con PBS, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y el precipitado celular se resuspendió en medio RPMI-1640 suplementado con FBS.

Tras el bloqueo con las distintas proteínas solubles o los anticuerpos, se procedió a realizar el experimento de citotoxicidad como se detalla previamente.

### 6.2. Ensayo de toxicidad frente a células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) de donante sano

Con el fin de evaluar si las poblaciones efectoras NK causaban algún tipo de hematotoxicidad, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad en los que se enfrentaron dichas células NK a células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) de donante sano a distintos ratios diana:efector. Para ello, se siguió el protocolo de marcaje y cuantificación de calceína liberada al sobrenadante del cocultivo previamente descrito para los ensayos de citotoxicidad.

## 7. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE MM RESISTENTES A BORTEZOMIB (BTZ)

La generación de la línea celular de MM ARP1 BCMA<sup>KO</sup> resistente a bortezomib (BTZ) (MedChemExpress), ARP1 KO R16, se obtuvo mediante exposición gradual a concentraciones subletales crecientes de BTZ iniciándose en 2 nM, e incrementando la dosis 2 nM cada vez que la línea celular empezaba a crecer notablemente. Este proceso demoró 3 meses hasta que la línea ARP1 BCMA<sup>KO</sup> empezó a crecer de manera estable en presencia de 16nM de BTZ. Posteriormente, se comprobó que la línea celular mantenía la condición de resistencia en cultivo, en ausencia de presión selectiva con el fármaco.

### 7.1. Estudio de las mutaciones de la línea resistente ARP1 KO R16

Para el estudio de las mutaciones existentes en la línea resistente a bortezomib ARP1 KO R16 generada en el laboratorio se procedió a la recolección de 1 millón de células para su posterior extracción de DNA utilizando el kit “DNeasy Blood and Tissue Kit” (Qiagen). El DNA extraído se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo

Fisher) y se envió a una empresa externa (Secugen) para la secuenciación Sanger de región codificante del gen PSMB5 por dos extremos.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias ya descritas y se rastrearon mutaciones de resistencia a BTZ descritas en la literatura [436] en el gen PSMB5 utilizando la herramienta de búsqueda de similitudes BLAST (NCBI).

Las células RPMI-8226-R7 utilizadas en este trabajo presentan una mutación en la subunidad PSMB5 del proteasoma (sustitución Thr21Ala), lo que afecta a la región de unión del BTZ [436]. Mientras que las células NCI-H929-R20 no presentan mutaciones de resistencia en la subunidad PSMB5, si no que se caracteriza por una alta expresión de PSMB5 detectada por qPCR [432].

## 8. WESTERN-BLOT (WB)

Anticuerpos primarios				
Antígeno	Clon	Especie	Procedencia	Referencia
p53	DO-7	Ratón	Agilent	M7001
p21	F-5	Ratón	Santa Cruz	sc-6246
p16	EP1551Y	Conejo	Abcam	ab51243
Vinculina	VIN-54	Ratón	Abcam	ab130007
$\beta$ -actina	Policlonal	Conejo	Cell signaling	4967
CD3z (CD247)	Policlonal	Ratón	BD Pharmingen	551033
Phospho-H2A.X (Ser139)	JBW301	Ratón	Merck	05-636-I
Anti-Ubiquitina	p4D1	Ratón	eBiosciences Invitrogen	14-6078-80
Phospho-HP1 $\gamma$ (Ser83)	Policlonal	Ratón	Cell signaling	2600
NF- $\kappa$ B p65	C22B4	Conejo	Cell signaling	4764
Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536)	93H1	Conejo	Cell signaling	3033
I $\kappa$ B $\alpha$	L35A5	Ratón	Cell signaling	4814
Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ (Ser32)	14D4	Conejo	Cell signaling	2849
NF- $\kappa$ B1 p105/p50	D4P4D	Conejo	Cell signaling	13586
Bcl-2	D55G8	Conejo	Cell signaling	4223
Bax	D2E11	Conejo	Cell signaling	5023
Chk2	1C12	Ratón	Cell signaling	3440
Phospho-Chk2 (Thr68)	Policlonal	Conejo	Cell signaling	2661
Anticuerpos secundarios				
Antígeno	Especie	Procedencia	Referencia	
anti-IgG ratón HRP-conjugado	Caballo	Cell signaling	7076	
anti-IgG conejo HRP-conjugado	Cabra	Cell signaling	7074	

**Tabla 6.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la caracterización celular por western-blot.

HRP, horseradish peroxidase; Ser, serina; Thr, treonina.

El precipitado celular a estudiar se lisó en solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía inhibidores de proteasas (Roche), inhibidores de fosfatasas (Merck) y 1% Tritón X-100 (Sigma Aldrich) para la extracción de proteínas. Las muestras se incubaron a 4°C en movimiento durante 30 minutos, se centrifugaron a 15 000 rpm 30 minutos a 4°C y posteriormente, se recogieron los sobrenadantes. Para la separación de las proteínas se usó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las muestras se prepararon en tampón de carga Laemmli con  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% y se incubaron a 99°C durante 10 minutos para su desnaturización. La electroforesis se realizó a voltaje constante (120 V) en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0.1%, pH 8.3).

Tras la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) a amperaje constante (350 mA) durante 90 minutos en un dispositivo de transferencia húmeda en tampón de transferencia. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con BSA (albúmina de suero bovino) al 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios que se detallan en la *Tabla 6*. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T (TBS- 0,1% Tween20) y se incubaron las membranas 30 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*, HRP) correspondientes. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se llevó a cabo la inmunodetección mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando kits comerciales (Amersham) en el documentador de geles Gel Doc™ EZ (Bio-Rad).

### 8.1. Detección de las moléculas CAR

Para la detección por western-blot de las moléculas CAR se empleó un anticuerpo dirigido contra CD3 $\zeta$  (Tabla 6), dominio señalizador presente en la estructura de todas las moléculas CAR utilizadas en este trabajo. La expresión de la molécula quimérica CAR se caracterizó en los distintos efectores por la presencia de bandas de alto peso molecular en comparación con sus controles.

### 8.2. Análisis de la actividad del proteasoma

Para el estudio indirecto de la inhibición del proteasoma se analizó la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas tras el tratamiento con Bortezomib (MedChemExpress) y/o el inhibidor de gamma secretasas (LY3039478, MedChemExpress). Las líneas celulares de MM sensibles (NCI-H929, ARP-1 BCMA<sup>KO</sup> y RPMI-8226) o resistentes a BTZ (BTZ NCI-H929 R20, ARP1 KO R16 y RPMI-8226 R7) se expusieron a ambos fármacos durante 24h. Pasado este tiempo, se recogieron las células para su posterior procesamiento y se analizaron por western-blot mediante detección con el anticuerpo anti-ubiquitina (Tabla 6).

### 8.3. Estudio de senescencia y daño en el ADN

El estudio de senescencia y daño en el ADN se llevó a cabo por western-blot (WB) en las líneas celulares de MM resistentes a BTZ NCI-H929 R20 y ARP1 KO R16 que habían sido tratadas durante 24-72h con los fármacos Bortezomib (MedChemExpress) y/o inhibidor de gamma secretasas (LY3039478, MedChemExpress).

Se analizaron los inhibidores de ciclo celular p21<sup>WAF-1</sup>, p53 y p16<sup>INK4a</sup>. Para la detección de daño por dobles roturas en el ADN se utilizó el anticuerpo anti-histona H2A.X fosforilada (pH2A.X) en la Ser139. Para medir la señalización en la respuesta a daño en el ADN se empleó el anticuerpo Chk2 y su forma fosforilada en la treonina 68. Estudiamos también *Heterochromatin protein 1* (HP1 $\gamma$ ) fosforilado en la Ser83, que es un marcador de célula en senescencia [437]. Todos los anticuerpos utilizados están descritos en la Tabla 6.

## 9. ENSAYO FLUORIMÉTRICO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA

Para evaluar la senescencia celular se utilizó un kit comercial que mide la actividad  $\beta$ -galactosidasa por ensayo fluorimétrico (BioVision). Se recogieron  $1 \times 10^6$  células, previamente lavadas con PBS, y se lisaron con tampón  $\beta$ -gal en hielo 10 min. Después, los lisados se centrifugaron a una velocidad de 10 000 g durante 5 min, a 4°C. Los sobrenadantes recogidos se dispusieron en una placa de 96 pocillos y se les añadió el sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa unido a fluoresceína. La hidrólisis por la enzima  $\beta$ -

galactosidasa celular de este sustrato no fluorescente genera galactosa y fluoresceína. La lectura de la fluorescencia emitida se realizó en modo cinético a 37°C durante 30 minutos en un lector de placas VICTOR Nivo™ (PerkinElmer). Para el cálculo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se utilizó una curva estándar de calibrado que contenía concentraciones crecientes de fluoresceína (0-50 pmol). La diferencia entre dos lecturas a tiempos distintos fue interpolada en la curva de calibrado para hallar la cantidad de fluoresceína (B) en pmol, y mediante la siguiente fórmula, se calculó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, siendo “T” el tiempo de reacción (min), “V” el volumen final de la reacción y una unidad de  $\beta$ -Galactosidasa la cantidad de enzima que genera 1  $\mu$ mol de fluoresceína por minuto a un pH de 7, a 37°C:

$$\text{Actividad } \beta\text{-Galactosidasa} = B/(\Delta T \times V) \times \text{Factor dilución} = \text{pmol/min}/\mu\text{l} = \mu\text{U}/\mu\text{l} = \text{mU/ml}$$

## 10. EXPERIMENTOS EN RATÓN

Todos los experimentos in vivo se llevaron a cabo utilizando ratones inmunodeficientes *non-obese diabetic (NOD) Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ* (NSG) macho de 8-10 semanas (Jackson Laboratory). El proyecto fue autorizado por las autoridades competentes de la Comunidad de Madrid con nº PROEX 191.2/20, bajo la legislación española y europea vigente (RD 53/2013 y la directiva europea 2010/63/EU). Los animales se mantuvieron en cajas ventiladas con un fotoperiodo día/noche de 12 horas, una temperatura de 20-25°C y humedad relativa de 55%±10%. En todo momento los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*. Los ratones recibieron una dosis subletal de irradiación gamma a 1,5 Gy de cuerpo completo, 4h antes de la infusión intravenosa por vena caudal de las líneas celulares de mieloma múltiple para facilitar su injerto. Las líneas celulares modificadas genéticamente utilizadas fueron U266 ffLucGFP y ARP1 KO R16 ffLucGFP. Las células NK-92 se irradiaron a distintas dosis (2,5-10 Gy) utilizando una fuente de rayos gamma previamente a su infusión intravenosa en los ratones. El esquema de tratamiento se detalla en cada experimento en resultados.

El peso de los ratones fue monitorizado semanalmente hasta que fueron sacrificados por aparición de síntomas de MM. Se definieron los siguientes criterios de punto final: pérdida de peso superior al 20%, astenia o paraplejia. Además, se registró la supervivencia y se recogieron muestras de tejidos en el momento de la necropsia, como

se describe en los apartados *11. Análisis estadístico* y *10.6. Análisis de injerto de las distintas poblaciones en sangre periférica, médula ósea y bazo*.

### 10.1. Análisis de biodistribución tumoral mediante imagen in vivo

La carga tumoral se monitorizó cada 1-2 semanas usando el equipo de captación de imagen multimodal para animales In-Vivo Xtreme Preclinical Optical/X-ray Imaging System (Bruker Sciences) hasta el punto final del experimento. Se inyectó a los ratones una solución acuosa de D-luciferina (ThermoFisher) 200mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) 7 min antes del inicio de la adquisición de imágenes. Durante este procedimiento, los ratones se anestesiaron con isofluorano al 2%. La toma de imágenes se llevó a cabo con un protocolo de luminiscencia con exposiciones de 5 min a una resolución de 8x8 píxeles y un campo de visión de 19 cm. La señal de luminiscencia obtenida se convirtió a unidades de fotones/segundo/mm<sup>2</sup>.

### 10.2. Análisis de la compatibilidad KIR-HLA

Se llevó a cabo el estudio de la compatibilidad HLA-KIR entre las líneas celulares de MM y las células CB-NK de los donantes utilizados en los experimentos de ratón. Para ello, se extrajo el ADN de todas las poblaciones utilizando el kit DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher). La tipificación de los KIR de los donantes se llevó a cabo en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de octubre, por la metodología SSO (“sequence specific oligonucleotide”) de muestras amplificadas por PCR, mediante tecnología Luminex® FLEXMAP 3D®, utilizando el kit de One Lambda KIR SSO Genotyping Test (ThermoFisher). Para el tipaje del HLA de la línea celular ARP1 KO R16 se utilizó el mismo protocolo, utilizando el kit de One Lambda LABType XR and CWD (ThermoFisher).

### 10.3. Análisis de lesiones líticas por rayos X

Para la visualización de las lesiones líticas causadas por las células de MM en los ratones se utilizó un protocolo de rayos X de alta resolución en el equipo In-Vivo Xtreme Preclinical Optical/X-ray Imaging System (Bruker Sciences). El campo de visión utilizado fue de 12 cm, resolución 1x1 píxeles y penetrancia de 0,4mm. Se identificaron

todas las lesiones óseas líticas, incluyendo aquellas en las que había una ruptura de la zona cortical o lesiones en sacabocados.

#### 10.4. Análisis de persistencia de los efectores inmunes

Para el análisis de persistencia de los efectores inmunes en el ratón se extrajo SP de la vena caudal de los ratones, a los tiempos post-infusión indicados en cada caso en resultados. La sangre extraída se analizó por CMF para determinar las poblaciones NK (CD56<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>), así como los niveles de expresión del CAR correspondiente (ver apartado 5.1. *Caracterización de las poblaciones: inmunofenotipo*).

#### 10.5. Análisis de injerto de las distintas poblaciones en sangre periférica, médula ósea y bazo

Se recogió SP y se extrajeron el bazo, fémures y tibias a la necropsia de los ratones. La MO se extrajo mediante la perfusión de PBE en la cavidad ósea de los fémures y las tibias con una jeringa y aguja de 25G. La suspensión celular de la MO y del bazo, disgregado mecánicamente en PBE, se hizo pasar por un filtro de 0,22µm. Los eritrocitos de todas las muestras celulares se lisaron utilizando buffer ACK (Gibco). Para evaluar la presencia de células mielomatosas se utilizó el anticuerpo CD138 PECy7 y la GFP expresada por las células modificadas fLucGFP. Para la detección de las células NK se utilizaron los anticuerpos CD56 APC, CD45 PerCPCy5.5, mientras que la expresión del CAR correspondiente fue analizada mediante el marcaje con el anticuerpo anti-NKG2D-PE o la proteína rhBCMA conjugada a biotina, seguida por incubación con estreptavidina-PE. Se utilizó el protocolo de citometría de flujo detallado anteriormente en 5. *Citometría de flujo*.

#### 10.6. Análisis histoquímico

Se llevó a cabo la extracción de los hígados de los ratones y se fijaron en formalina al 10% durante 2 días. Además, el fémur derecho de cada ratón se fijó en 10% formalina durante 48h y posteriormente se decalcificó en solución 10% EDTA (pH 7,4) durante dos semanas. Todos los tejidos fueron embebidos en bloques de parafina y se cortaron secciones de 5µm, que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico.



Las preparaciones se capturaron con una cámara digital (Leica ICC50 W) conectada al microscopio Leica DM2000 LED (Leica Microsystems), a un aumento de 20x.

### 10.7. Análisis del plasma de los ratones

Se llevó a cabo la extracción del plasma en el momento de la necropsia. Se extrajo la SP de los ratones y se centrifugó a 300g durante 10 min. A continuación, se retiró el precipitado celular y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 1000g durante 10 min. Los plasmas se conservaron a -80°C hasta su análisis.

## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8. Los resultados se expresan como la media aritmética de los valores de experimentos independientes y su error estándar de la media (SEM). Para comprobar si las variables cumplían los criterios para aplicar test paramétricos, se llevaron a cabo las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y de homocedasticidad o igualdad de varianzas (Test de Levene). Para las variables con distribución normal se utilizaron los T-test o ANOVA de una o dos vías para comparar poblaciones, utilizando el análisis post-hoc de Tukey en el caso de comparaciones múltiples. Cuando las variables resultaron en una distribución no paramétrica se utilizó la prueba de U de Mann-Witney-Wilcoxon para comparar dos muestras independientes o el test de Kruskal-Wallis para tres o más grupos. En las gráficas se indica la significación estadística de la siguiente manera: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Para las curvas de supervivencia de los ratones se utilizó un método univariable de Kaplan-Meier para la representación de los datos, y se llevó a cabo el análisis Log Rank (Mantel-Cox) para ver las diferencias estadísticas entre grupos.

## **5. RESULTADOS**



# 1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NK-92MI TRANSDUCIDAS CON LOS CAR DE SEGUNDA GENERACIÓN NKG2D Y BCMA COMO TERAPIA FRENTE A MM

## 1.1. Construcción de lentivectores CAR

El plásmido de transferencia que codifica para la expresión del CAR NKG2D 41BB $\zeta$  (41BB-CD3 $\zeta$ ) fue cedido por Daniel J. Powell Jr. (Perelman School of Medicine, Pennsylvania, EEUU). Este CAR presenta el ectodominio del receptor NKG2D (secuencia aminoacídica 82-216) unido a la región bisagra y transmembrana del receptor CD8 $\alpha$  seguida del dominio coestimulador 41BB y el dominio de activación CD3 $\zeta$  (Fig. 20A, izquierda). Para la generación del CAR BCMA 41BB $\zeta$  se sustituyó el ectodominio del receptor NKG2D por la secuencia que contenía la scFv anti-BCMA procedente del anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano J22.9-xi (4ZFO, ProteinDataBase) (Fig. 20A, derecha).

## 1.2. Generación y caracterización de las células NK-92MI CAR

Para generar las células NK-92MI con los lentivectores (LV) CAR de segunda generación NKG2D y BCMA, se transdujeron a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se seleccionaron mediante separación celular por citometría de flujo, que permitió alcanzar en el cultivo una pureza cercana al 100% de expresión de ambos CAR (Fig. 20B). La expresión de los dos CAR fue estable en el tiempo, incluso tras repetidos ciclos de congelación y descongelación. Para evaluar si ambas poblaciones tenían una integración similar de las construcciones CAR que permitiera comparar la potencia de ambas moléculas CAR en ensayos funcionales, analizamos el número de copias del LV por célula. Los valores obtenidos por q-PCR fueron:  $0,656 \pm 0,027$  copias de NKG2D CAR y  $0,797 \pm 0,038$  copias de BCMA CAR, respectivamente (Fig. 20C).

Se corroboró la expresión de las moléculas CAR en los efectores por *western blot* empleando el anticuerpo anti-CD3 $\zeta$ . Para obtener el tamaño teórico de los CAR se tradujo la secuencia nucleotídica mediante la herramienta informática *Expasy translate* y a partir de la secuencia aminoacídica obtenida se calculó el peso molecular utilizando la herramienta *Expasy compute pI/Mw*. El análisis por *western blot* permitió detectar una

proteína de peso similar al teórico de 43,5 kDa estimado para el CAR NKG2D y una proteína de peso molecular teórico del CAR BCMA (53,9 kDa) (Fig. 20D).

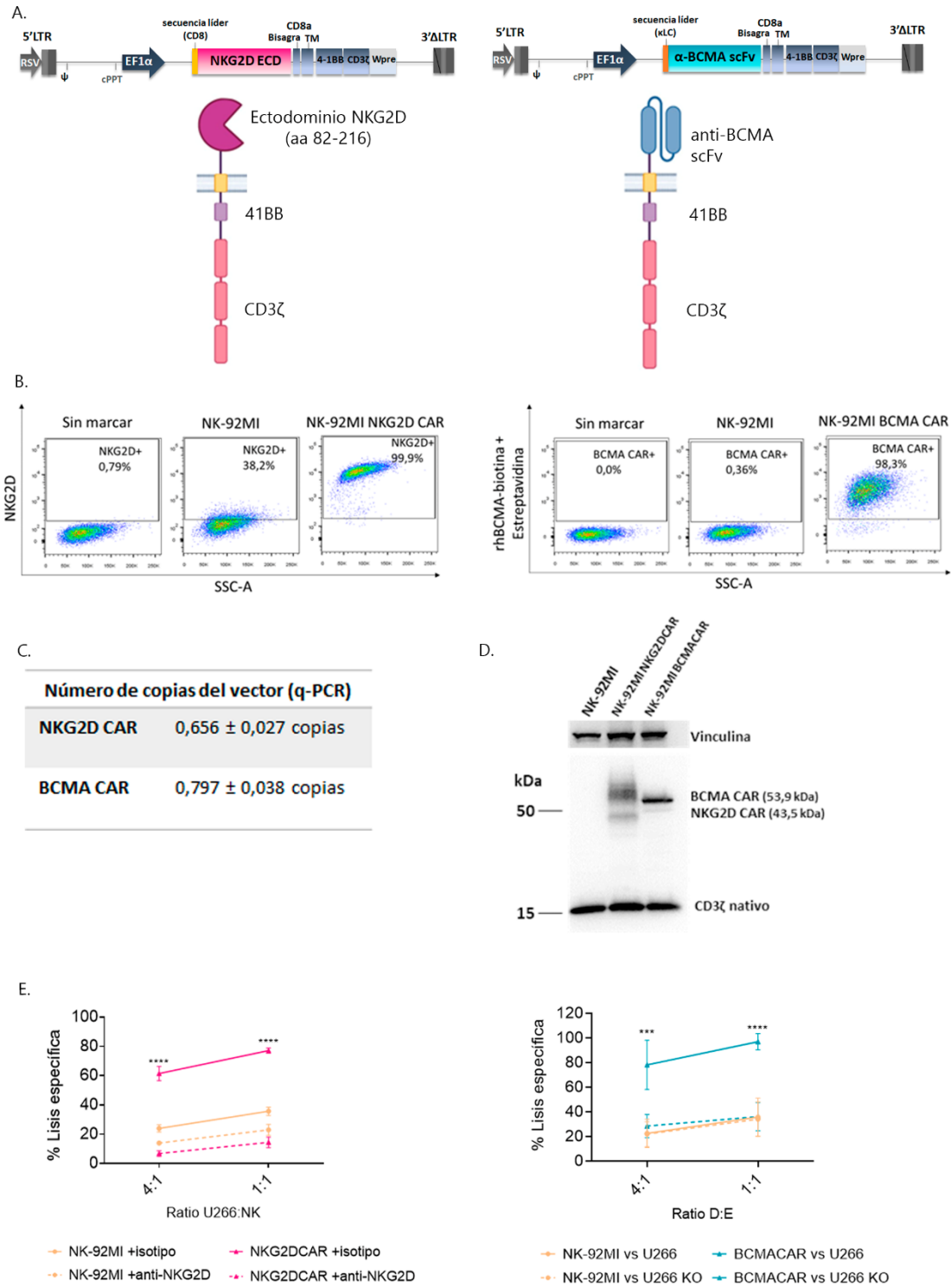
Antes de comparar la eficacia de las poblaciones efectoras NK-92MI NKG2D y BCMA CAR, quisimos verificar que el reconocimiento de los CAR era específico de sus correspondientes ligandos. En el caso de NKG2D CAR, puesto que todas las líneas celulares de MM expresan al menos uno de los NKG2D-L y sería necesario suprimir varios ligandos en la mayoría de las líneas celulares, decidimos bloquear el receptor con un anticuerpo antagonista anti-NKG2D. De esta forma, al bloquear la población efectora NK-92MI NKG2D CAR con el anticuerpo neutralizante anti-NKG2D, la lisis se redujo un 62.6% a ratio 1:1 con respecto a la lisis obtenida en presencia de isotipo frente a la línea celular de MM U266, corroborando la especificidad del CAR NKG2D (Fig. 20E, panel izquierdo). En el caso de BCMA, se llevó a cabo la supresión de la expresión de BCMA en la línea celular de MM U266, U266 BCMA<sup>KO</sup> (denominada de aquí en adelante U266 KO) mediante el sistema CRISPR/Cas9, como se detalla en la fig. 20F. Las células U266 y U266 KO se enfrentaron a la población NK-92MI y NK-92MI BCMA CAR. Al suprimir la expresión de BCMA, la eficacia antitumoral de la población NK-92MI BCMA CAR se veía comprometida (reducción de un 60,8% de lisis tumoral a ratio 1:1) hasta igualar la lisis específica de la población NK-92MI no transducida (Fig. 20E, panel derecho), lo que evidencia la especificidad del CAR BCMA por su ligando, BCMA.

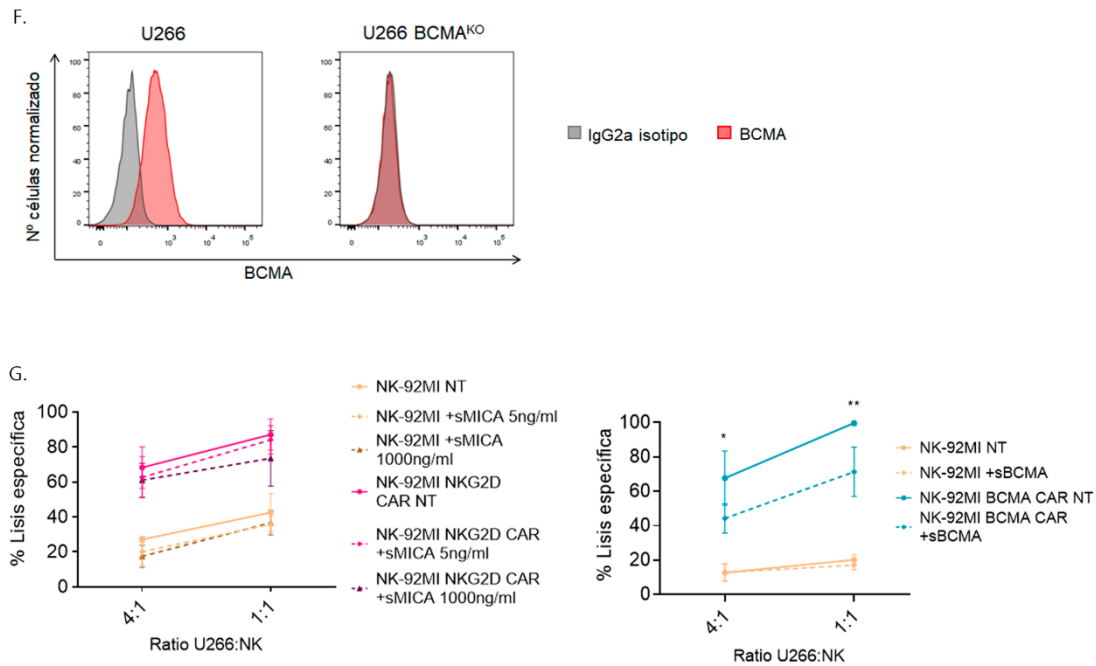
MICA es el ligando más importante del receptor NKG2D. Se ha descrito que la sobreexpresión de MICA soluble (sMICA) en el suero de los pacientes de MM correlaciona con la progresión del tumor [200]. Quisimos comprobar si la presencia de sMICA podía interferir en la actividad lítica de las células efectoras NK-92MI NKG2D CAR. Para ello, realizamos un ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular de MM U266 en presencia de concentraciones de sMICA de 5ng/ml, en el rango de concentración cuantificada en el suero de los pacientes de MM, así como a concentración suprafisiológica (1000 ng/ml). Los resultados revelaron que la eficacia antitumoral de la población NK-92MI NKG2D CAR no se veía afectada en presencia de ninguna de las concentraciones de sMICA ensayadas (Fig. 20G, panel izquierdo).

Los niveles de BCMA soluble (sBCMA) también se encuentran elevados en el suero de los pacientes con MM y correlacionan con el estado clínico del paciente y la progresión de la enfermedad [438]. Ensayos in vitro han demostrado que el sBCMA disminuye la potencia citotóxica de las células T BCMA CAR [439] por lo que quisimos estudiar si

este mismo mecanismo podía reducir la actividad anti-MM de las células NK-92MI BCMA CAR. Los resultados mostraron que el sBCMA, a la concentración media cuantificada en el suero de pacientes con MM (500 ng/ml), redujo significativamente la actividad antitumoral de la población NK-92MI BCMA CAR sobre las células U266 (reducción de un 28,4% de lisis tumoral a ratio 1:1, Fig. 20G panel derecho) mientras que la citotoxicidad de la población NK-92MI parental no se modificaba.

Por tanto, la caracterización de las células NK-92MI NKG2D CAR y BCMA CAR generadas evidenció una expresión similar de las moléculas CAR en ambas poblaciones, la especificidad de las construcciones CAR por sus ligandos y que sBCMA es capaz de neutralizar la actividad lítica de la población NK-92MI BCMA CAR.





**Figura 20. Generación y caracterización de la actividad lítica de las células NK-92MI CAR.**

A) Estructura de los CAR de segunda generación NKG2D y BCMA. B) Gráfico de puntos del análisis por citometría de flujo de la expresión del receptor NKG2D y de BCMA CAR en las células NK-92MI transducidas. C) Cuantificación mediante q-PCR del número de copias del vector en las células NK-92MI transducidas con el CAR NKG2D o BCMA. D) Detección por western-blot de las moléculas CAR en las distintas poblaciones NK92MI CAR mediante el marcaje con el Ac anti-CD3 $\zeta$ . E) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK92MI NKG2D CAR (izquierda) en presencia del anticuerpo anti-NKG2D (10ug/ml) o su correspondiente isotipo (IgG1) frente a la línea celular U266, y de las células NK92MI CAR BCMA (derecha) frente a la línea celular U266 o U266 BCMA<sup>KO</sup>. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. F) Histograma representativo del análisis por citometría de flujo de la expresión de BCMA tras la supresión de su expresión en la línea celular de MM U266 mediante edición génica CRISPR/Cas9. G) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK92MI NKG2D CAR (izquierda) en presencia o ausencia (NT) de sMICA 5ng/ml o 1000ng/ml, y de las células NK92MI CAR BCMA (derecha) en presencia o ausencia (NT) de sBCMA 500 ng/ml frente a células U266. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. LTR: repeticiones terminales largas; EF1 $\alpha$ : factor de elongación 1  $\alpha$  ECD, ectodominio; TM: transmembrana; kDa, kilodalton; ratio D:E, ratio diana:efector; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### 1.3. La expresión de los CAR NKG2D y BCMA en las células NK-92MI mejora la eficacia antitumoral in vitro de la población parental frente a líneas celulares de MM

Para comparar la potencia citotóxica de los tratamientos NK-92MI CAR frente a su línea parental, seleccionamos una batería de líneas celulares de MM con distinta expresión de los ligandos diana BCMA y/o ligandos de NKG2D (NKG2D-L) (Fig. 21A): la línea celular U266 presenta una elevada y similar expresión de NKG2D-L y BCMA, mientras que las células ARP1 muestran niveles equivalentes pero inferiores de ambos ligandos



NKG2D-L y BCMA; la línea celular XG1 expresa altos niveles de BCMA pero presenta expresión reducida de NKG2D-L; y la línea celular K562 se usó como control positivo para el CAR de NKG2D, ya que posee una elevada expresión de NKG2D-L y no expresa BCMA.

En la comparación de la actividad citotóxica de las diferentes poblaciones efectoras frente a las distintas líneas celulares de MM observamos que la línea NK-92MI parental mostraba una lisis específica mucho menor que la producida por las poblaciones NKG2D y BCMA CAR (Fig. 21B). Además, la eficacia antitumoral de ambos efectores CAR fue muy similar cuando se enfrentaron a líneas celulares con expresión equivalente de ambos ligandos, como U266 o ARP1. La lisis específica producida por la población NK-92MI NKG2D CAR frente a U266, que presenta una expresión muy similar de ambos ligandos (13,9 veces NKG2D-L y 13,1 veces BCMA), a ratio 1:1 fue de  $83,19 \pm 6,57\%$  frente al  $91,91 \pm 3,01\%$  de lisis producida por la población NK-92MI BCMA CAR (Fig.21B). Un resultado similar se obtuvo frente a las células ARP-1, cuya expresión de ligandos es 5,6 veces NKG2D-L y 5,5 veces BCMA sobre la FMO. En este caso, la lisis específica alcanzada por la población NK-92MI NKG2D CAR a ratio 1:8 fue  $84,92 \pm 2,69\%$  frente a  $83,22 \pm 5,50\%$  obtenida por la población NK-92MI BCMA CAR alcanzaba una mayor actividad lítica. La población NK-92MI BCMA CAR presenta una ventaja frente a la línea celular XG-1, ya que estas células expresan mayor cantidad del ligando BCMA (10,2 veces BCMA frente a 3,2 veces NKG2D-L), y a ratio 1:8 la lisis específica obtenida para esta población fue  $85,37 \pm 2,66\%$  frente a  $54,92 \pm 2,14\%$  para la población NK-92MI NKG2D CAR. De manera inversa, la lisis producida por la población NK-92MI NKG2D CAR frente a la línea celular K562 que expresa 20 veces NKG2D-L y 2,3 veces BCMA sobre la FMO (estos valores son considerados ausencia de expresión de BCMA ya que la mínima expresión se debe a señal de auto fluorescencia en ausencia de isotipo) a ratio 1:1 fue  $94,08 \pm 2,79\%$  frente a  $25,47 \pm 3,89\%$  producido por la población NK-92MI BCMA CAR. Además, las diferencias encontradas en citotoxicidad frente a la línea celular de MM U266 KO (13,4 veces NKG2D-L y 3,1 veces BCMA) a ratio 1:1 fueron de  $91,79 \pm 4,60\%$  para la población NK-92MI NKG2D CAR y  $46,49 \pm 2,29\%$  para la población NK-92MI BCMA CAR (Fig. 21B). En general, los resultados sugieren una asociación entre el nivel de expresión de ligandos en la célula diana y la lisis tumoral producida por las poblaciones efectoras CAR.

Adicionalmente, llevamos a cabo la cuantificación de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cocultivo de las poblaciones efectoras con las células diana U266 (Fig. 21C), y observamos que la población NK-92MI NKG2D CAR producía significativamente una mayor concentración de IFN- $\gamma$  ( $1837,33 \pm 515,58$  pg/ml) que las células NK-92MI ( $55,71 \pm 4,51$  pg/ml) y NK-92MI BCMA CAR ( $451,72 \pm 180,13$  pg/ml).

#### 1.4. La potencia citotóxica de las células NK-92MI BCMA CAR es superior a la de la población NK-92MI NKG2D CAR sobre células plasmáticas primarias de MM

Una vez comprobada la actividad citotóxica de las células NK-92MI CAR sobre líneas celulares de MM se evaluó la misma función sobre células plasmáticas procedentes de 6 pacientes de MM, tres al diagnóstico (DX) y otros tres en el momento de la recaída (R/R). Las características de estos pacientes se detallan en la Tabla 7. Tras la purificación de las células plasmáticas, se analizó la expresión de NKG2D-L y BCMA por citometría de flujo, que evidenció la expresión de los ligandos diana de las moléculas CAR estudiadas en las células plasmáticas de todos pacientes de MM, aunque a niveles variables (Fig. 21D).

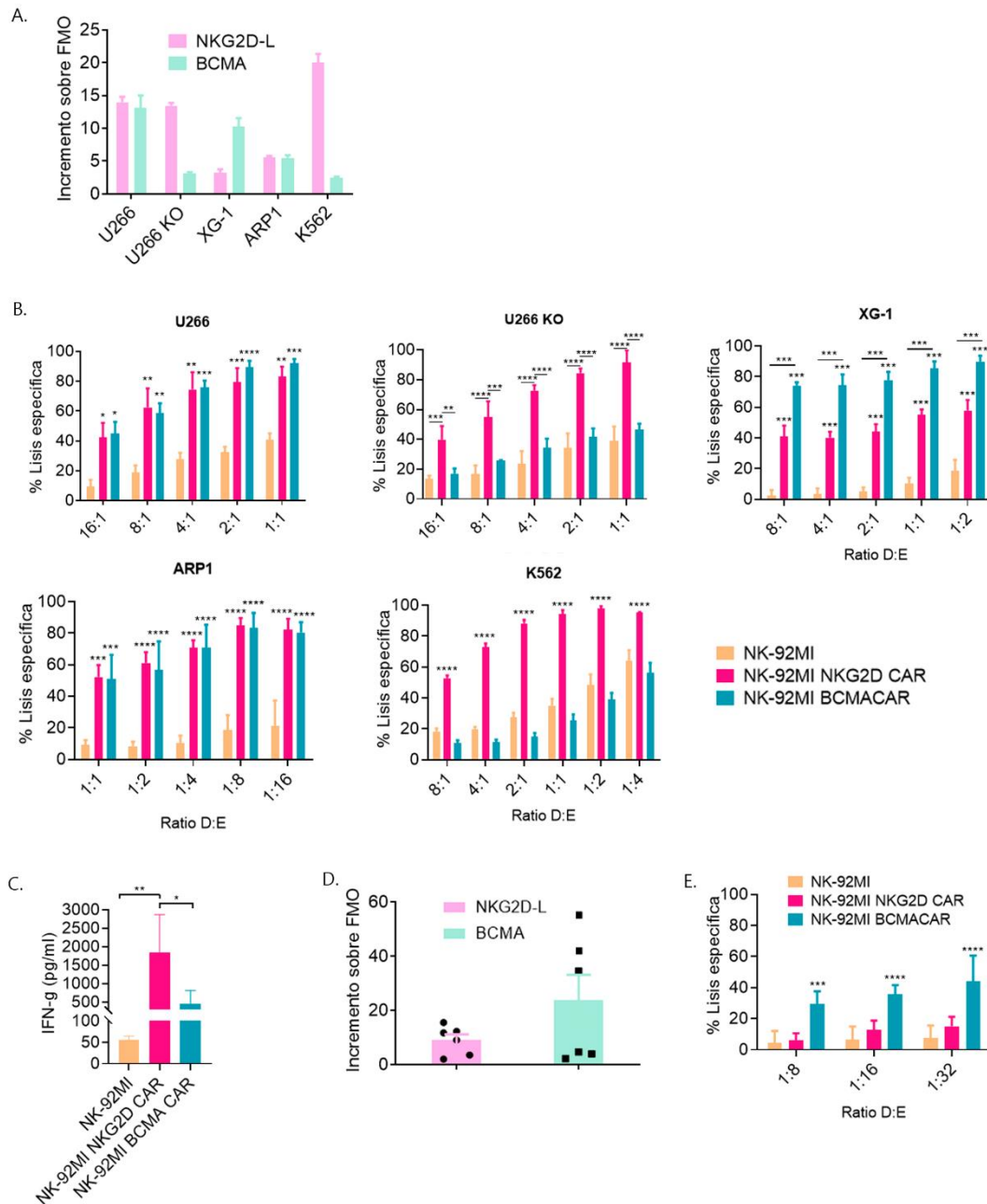
Para analizar la potencia citotóxica de nuestra inmunoterapia NK-92MI CAR sobre las células plasmáticas purificadas de pacientes de MM realizamos un ensayo de citotoxicidad en el que observamos que la población NK-92MI BCMA CAR presentaba una actividad antitumoral significativamente mayor que las células NK-92MI parentales ( $44,23 \pm 6,69\%$  vs  $7,59 \pm 3,57\%$  a ratio 1:32,  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, la población NK-92MI NKG2D CAR mostraba una menor potencia citotóxica que las células NK-92MI BCMA CAR ( $15,15 \pm 2,46\%$  vs  $44,23 \pm 6,69\%$  a ratio 1:32,  $p < 0,0001$ ), aunque superior a la población NK-92MI ( $15,15 \pm 2,46\%$  vs  $7,59 \pm 3,57\%$  a ratio 1:32,  $p > 0,999$ ; Fig. 21E).

En su conjunto, estos resultados muestran que las poblaciones NK-92MI CAR generadas poseen una mayor actividad antitumoral que las células NK-92MI parentales frente a líneas celulares y células plasmáticas primarias de MM.

N°	Edad	Momento	% CP	Tipo/ISS	Tratamiento	Isotipo	Expresión NKG2D-L	Expresión BCMA
#1	64	R/R	36	ISS I	KD (6ª línea)	IgG lambda	9	2
#2	56	DX	23	-	-	IgA lambda	2	4
#3	45	R/R	13,2	IIIA	D + Rd (2ª línea)	IgG kappa	12	55
#4	65	DX	52	ISS I-II	-	IgA lambda	16	42
#5	73	R/R	54	IIIA- ISSII	VD + Selinexor (4ª línea)	IgG kappa	4	5
#6	81	DX	12	ISS-R I	-	IgG kappa	12	35

**Tabla 7. Características de los pacientes de MM al diagnóstico o en recaída.**

R/R: recaída; DX: diagnóstico; CP: células plasmáticas analizadas por citometría de flujo; K: carfilzomib; D: dexametasona; R: lenalidomida; V: velcade (bortezomib); Expresión de NKG2D-L y BCMA analizada como veces de incremento sobre la FMO.



**Figura 21. Las células NK-92MI CAR superan la eficacia antitumoral de las células NK-92MI parentales.**

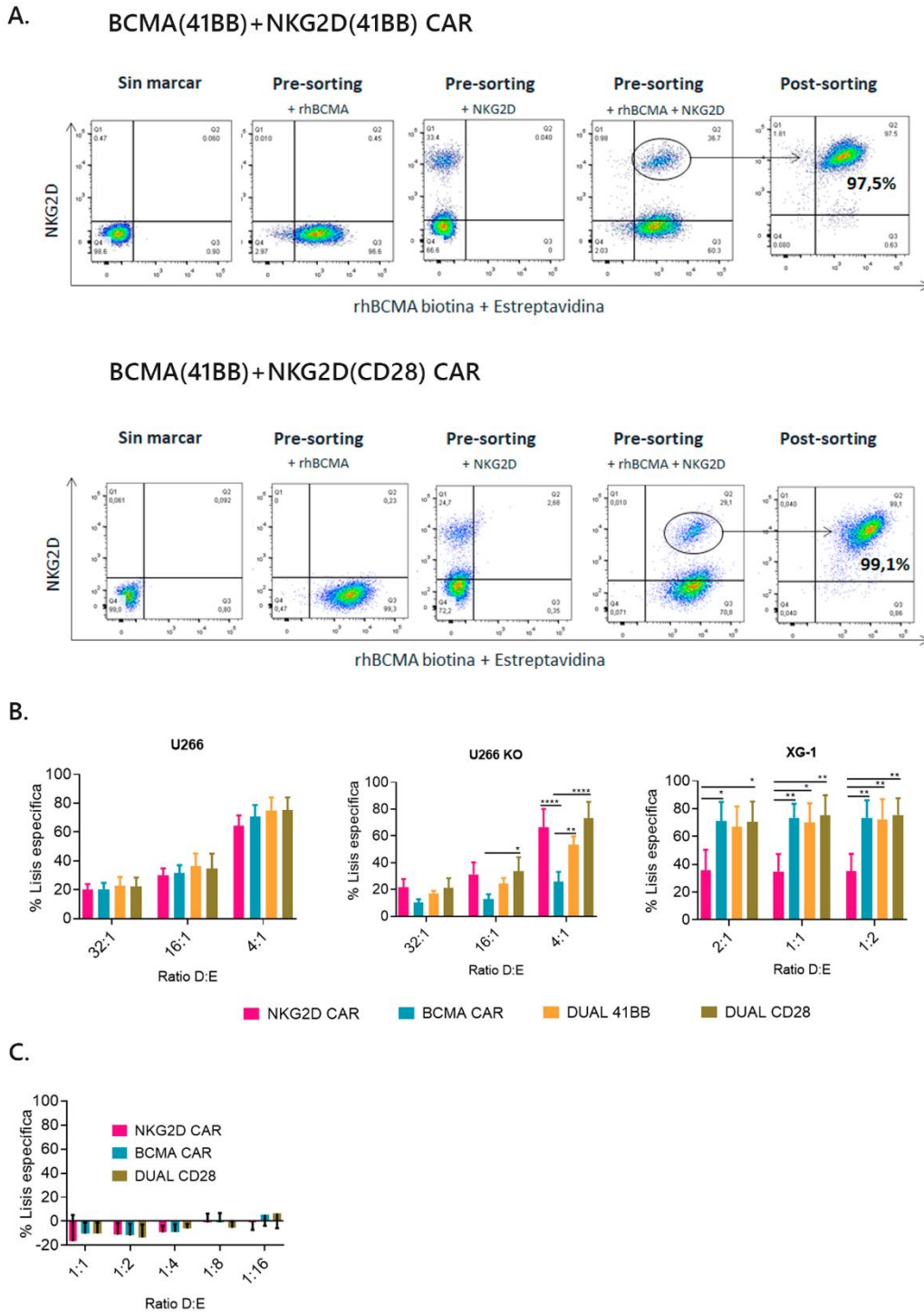
A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de los ligandos de los CAR NKG2D y BCMA en distintas líneas de MM (n=3, media ± SEM). B) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI, NK-92MI NKG2D CAR y NK-92MI BCMA CAR frente a las líneas celulares de MM U266, U266 KO, XG-1 y ARP1 y la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (n=3, media ± SEM). C) Cuantificación mediante citometría de flujo con el panel humano CD8/NK LEGENDplex™ de la producción de IFN- $\gamma$  por las distintas poblaciones efectoras tras el cocultivo durante 24h con la línea celular U266 (n=3, media ± SEM). D) Expresión de NKG2D-L y BCMA en las células plasmáticas de los pacientes de MM al diagnóstico (DX) y en recaída (R/R) (n=6, media ± SEM). E) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI, NK-92MI NKG2D CAR y NK-92MI BCMA CAR frente a células plasmáticas purificadas de muestras de MO de los pacientes de MM, descritos en la tabla 7 (n=6, media ± SEM). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

## 2. LA COEXPRESIÓN DE LOS CAR NKG2D Y BCMA EN LAS CÉLULAS NK-92MI INCREMENTA LA COBERTURA CITOTÓXICA SOBRE LÍNEAS CELULARES DE MM PERO NO EXHIBE UNA SINERGIA EN CUANTO A LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Con el fin de potenciar nuestra inmunoterapia y evitar el escape por la pérdida de expresión de una de las dianas CAR, generamos células NK-92MI que coexpresaran los CAR NKG2D y BCMA en la misma célula (dual 41BB). Para ello, transdujimos las células NK-92MI BCMA CAR con el CAR NKG2D a MOI 10, obteniendo de nuevo una expresión estable de ambos CAR (Fig. 22A). El ensayo de citotoxicidad sobre células U266, U266 KO y XG-1 no mostró una mejora significativa en la eficacia antitumoral de esta población con coexpresión de los CAR con respecto a las transducidas con los CAR simples (Fig. 22B). Como estas construcciones CAR contienen el mismo dominio coestimulador 41BB quisimos expresar en la misma célula moléculas CAR que tuvieran distintos dominios coestimuladores para potenciar rutas distintas de activación celular. Debido a que las células NK-92 expresan de forma constitutiva el receptor CD28 y poseen señalización endógena, construimos un CAR NKG2D con un dominio coestimulador de CD28, que señala a través de rutas distintas a 41BB, fundamentalmente por la vía PI3K-AKT [440]. Para la generación del CAR NKG2D CD28 $\zeta$  se sustituyó la región de los coestimuladores 41BB-CD3 $\zeta$  por CD28-CD3 $\zeta$ . Transdujimos las células NK-92MI BCMA CAR (que contenía el coestímulo 41BB) con el CAR NKG2D (que contiene el coestímulo CD28) a MOI 10 y una vez obtenida una población pura con expresión estable de ambos CAR (dual CD28), llevamos a cabo un ensayo de citotoxicidad con todas las poblaciones CAR simples y duales. Los resultados muestran una cobertura citotóxica, aunque no una sinergia en la actividad lítica sobre las líneas celulares que expresan de forma diferencial los ligandos CAR, como las células U266 KO o XG1 (Fig. 22B). La lisis obtenida a ratio 4:1 frente a la diana U266 KO, con alta expresión de NKG2D-L y ausencia de BCMA, fue de  $66,52 \pm 7,78\%$ ,  $53,31 \pm 3,65\%$  y  $73,04 \pm 1,1\%$  para las poblaciones NK-92MI NKG2D CAR, NK-92MI dual41BB y NK-92MI dualCD28, respectivamente. En el análisis frente a la línea celular XG1, con alta expresión de BCMA y baja de NKG2D-L, la lisis obtenida a ratio 1:2 fue de  $73,36 \pm 6,35\%$ ,  $72,42 \pm 7,23\%$  y  $75,44 \pm 6,06\%$  para las poblaciones NK-92MI BCMA CAR, NK-92MI dual41BB y NK-92MI dualCD28, respectivamente (Fig. 22B).

Asimismo, quisimos evaluar la potencial toxicidad hematológica de las células NK-92MI CAR generadas. Para ello llevamos a cabo el cocultivo de las diferentes poblaciones CAR frente a células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos y observamos que ninguna de las poblaciones efectoras, ni con expresión de CAR simples ni CAR dual, resultaban hematotóxicas (Fig. 22C). El porcentaje máximo de lisis celular obtenido a ratio 1:16 fue de un  $6,57 \pm 5,5\%$ .

Los resultados sugieren que la expresión dual de los CAR NKG2D y BCMA en la misma célula NK-92MI no incrementa de forma sinérgica la actividad antitumoral incluso utilizando dominios coestimuladores que señalizan por distintas rutas de activación, pero suponen una ventaja respecto a la expresión simple de los mismos CAR al aumentar la cobertura citotóxica sobre los ligandos diana.



**Figura 22.** Las células NK-92MI que coexpresan los CAR NKG2D y BCMA no exhiben mayor potencia antitumoral que las células con expresión simple de los CAR, aunque muestran una mayor cobertura citotóxica.

A) Gráfico de puntos representativo del análisis por citometría de flujo de la expresión DUAL de los CAR que presentan el mismo dominio coestimulador 41BB (superior) o combinando 41BB y CD28 (inferior) transducidos con lentivectores. Se muestran los análisis previos y posteriores a su selección. B) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI NKG2D CAR, NK-92MI BCMA CAR, NK-92MI dual41BB y NK-92MI dualCD28 frente a células U266, U266 KO y XG-1. (n=3, media ± SEM). C) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI NKG2D CAR, NK-92MI BCMA

CAR y NK-92MI dualCD28 frente a células mononucleadas de SP procedente de donantes sanos (n=5, media  $\pm$  SEM). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001.

### 3. LA IRRADIACIÓN A DOSIS CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS NK-92MI CAR ANULA POR COMPLETO SU EFICACIA ANTITUMORAL IN VIVO

Para evitar la tumorigénesis, las células NK-92MI han de ser irradiadas antes de su uso clínico para detener su proliferación in vivo, por lo que quisimos comprobar inicialmente que la dosis aprobada para la administración de esta terapia celular en pacientes no afectaba a su capacidad citotóxica in vitro. Para ello, irradiamos las células NK-92MI y NK-92MI NKG2D CAR a 10Gy y, tres horas después, llevamos a cabo un ensayo de citotoxicidad frente a la línea celular de MM U266. Las células NK-92MI irradiadas a 10Gy no mostraron diferencias significativas respecto a las células sin irradiar en cuanto a porcentaje de lisis tumoral, tanto en las células parentales como en las que expresaban el CAR NKG2D (Fig. 23A).

Una vez corroborada la actividad antitumoral in vitro de las células NK-92MI NKG2D CAR irradiadas llevamos a cabo un experimento in vivo para comparar la eficacia de las poblaciones acondicionadas a 10Gy NK-92MI NKG2D CAR y NK-92MI BCMA CAR frente a MM. En ratones macho inmunodeficientes de 8-10 semanas *non-obese diabetic (NOD) Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ* (NSG) se generó un modelo de MM mediante infusión intravenosa de  $4 \times 10^6$  células modificadas U266ffLucGFP. Tras 72 horas, se administraron  $16 \times 10^6$  células NK-92MI CAR por vía intravenosa, una vez a la semana durante 4 semanas. Mientras que la supervivencia media del grupo U266ffLucGFP fue de 63 días, el tratamiento con células NK-92MI NKG2D CAR o NK-92MI BCMA CAR no incrementó de forma significativa la supervivencia media de los ratones (2 y 9 días, respectivamente) (Fig. 23B). Como con las dosis administradas las células NK-92MI CAR irradiadas a 10 Gy resultaron no ser eficaces in vivo frente a MM, quisimos aplicar otro esquema de tratamiento, reduciendo la infusión de U266ffLucGFP a  $1 \times 10^6$  células y administrando tres dosis de  $10 \times 10^6$  células NK-92MI CAR cada 2-3 días. (Fig. 23C). El tratamiento no aumentó significativamente la supervivencia de los ratones infundidos con células NK-92MI NKG2D CAR (65 días) o BCMA CAR (70 días) en comparación con los ratones sin tratamiento (66 días). Por tanto, los resultados indicaban que las



células NK-92MI CAR irradiadas no presentaban eficacia antitumoral *in vivo*, ni con esquemas de tratamiento en multidosis poco espaciadas en el tiempo.

Con el fin de estudiar la persistencia limitada de las células NK-92MI CAR irradiadas en los ratones podía ser la responsable de la falta de eficacia antitumoral, se llevó a cabo un análisis de la sangre por venopunción de los animales a las 3 y 48h después de la infusión de la terapia. El análisis por citometría de flujo mostró que a las 3h post-infusión las células NK-92MI CAR irradiadas a 10Gy permanecían en circulación, mientras que tras 48h ya no eran detectables en SP (Fig. 23D). Los resultados obtenidos en los primeros ensayos piloto sugieren que la baja persistencia *in vivo* de las células NK-92MI CAR irradiadas puede dificultar su eficacia anti-MM.

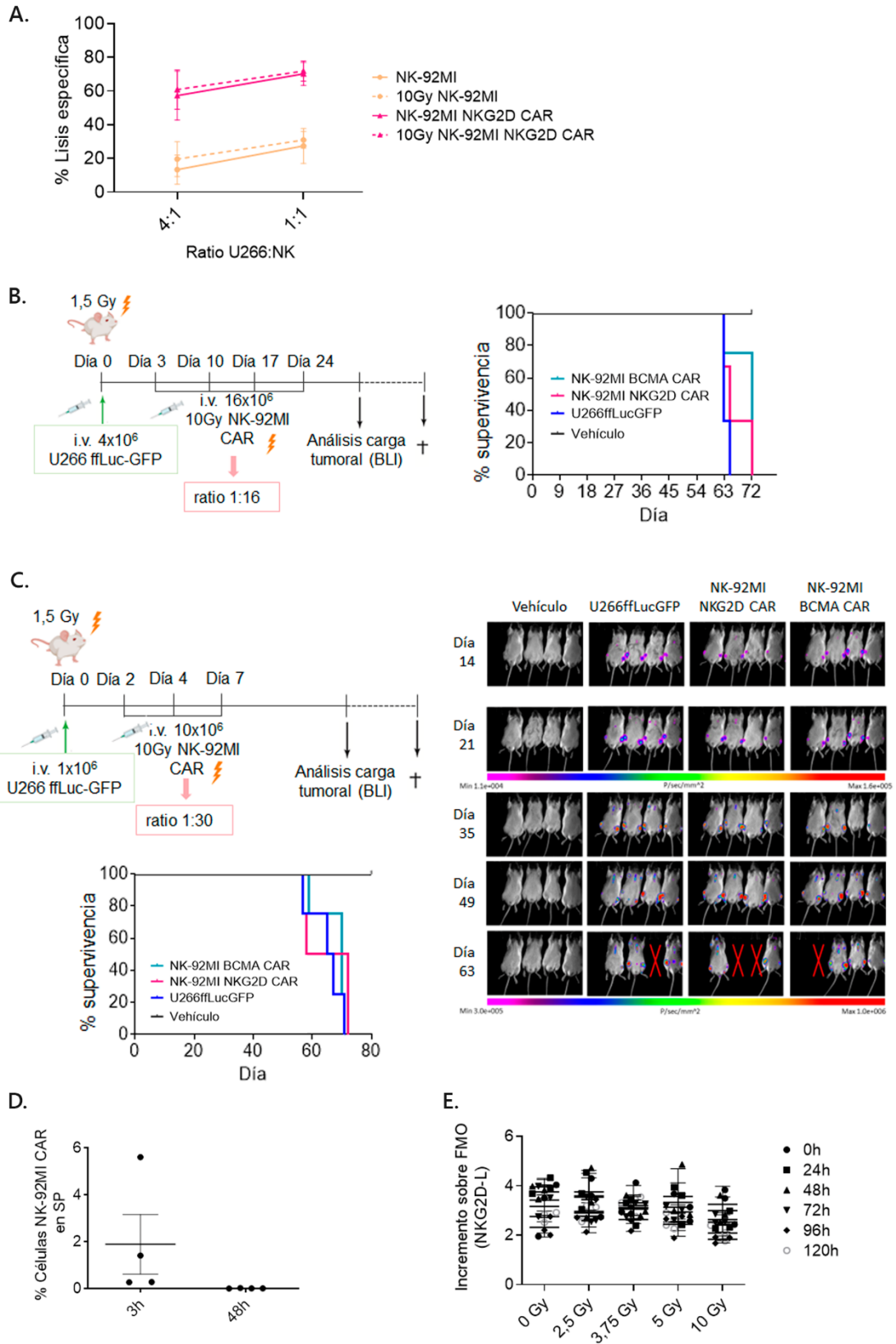
### 3.1. Dosis de irradiación inferiores a la dosis clínica aumentan ligeramente la persistencia *in vitro* de las células NK-92MI CAR

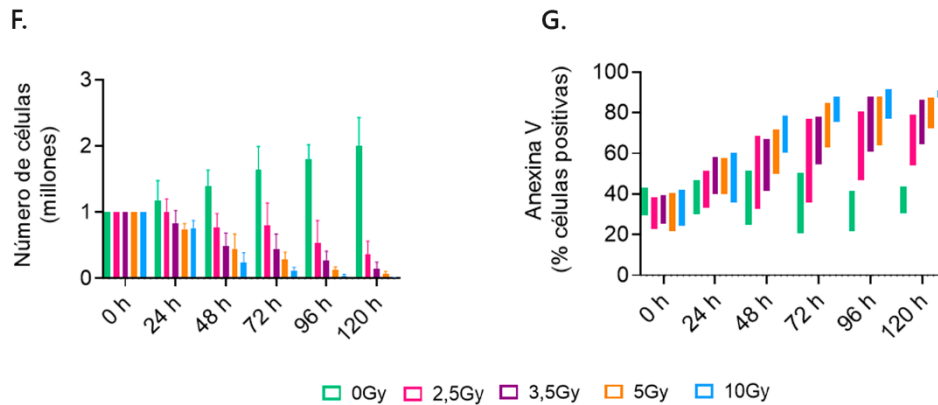
Debido a la ineficacia *in vivo* de las células NK-92MI CAR irradiadas a la dosis clínica de 10 Gy, quisimos investigar si existe una dosis de irradiación idónea que permita un periodo de actuación de las células más prolongado, pero asegure su completa eliminación para evitar que puedan proliferar dentro del animal.

Como se ha descrito que las radiaciones ionizantes aumentan la expresión de los NKG2D-L en células tumorales [441] quisimos evaluar primero si la irradiación podía aumentar la expresión de estos ligandos en las células NK-92MI y, en consecuencia, producir fratricidio en la población NK-92MI NKG2D CAR que pudiera justificar la disminución de la persistencia *in vivo*. Ensayamos distintas dosis de irradiación entre 0 - 10 Gy y analizamos la expresión de NKG2D-L en las células NK-92MI NKG2D CAR a distintos tiempos (0 - 120 h). La ausencia de variación significativa de la expresión de NKG2D-L en el tiempo a cualquiera de las dosis de irradiación ensayadas (Fig. 23E) sugiere que la disminución de la persistencia de las células NK-92MI NKG2D CAR no está mediada por el reconocimiento NKG2D CAR/NKG2D-L que facilite la eliminación entre las células efectoras.

Para investigar si la reducción de la dosis de irradiación de las células NK-92MI CAR permite aumentar la eficacia, pero sin generar un linfoma NK en los animales, realizamos unos estudios iniciales *in vitro*, mediante un ensayo de proliferación acumulativa y un análisis de apoptosis celular a dosis decrecientes de irradiación inferiores a la dosis

clínica. Para el estudio de proliferación se cultivaron las células NK-92MI NKG2D CAR a una concentración de 0.5 millones/ml en ausencia de IL-2, y se mantuvieron durante el tiempo indicado, sin renovación del medio de cultivo. Este ensayo mostró que tras 48 horas solo un 24% de las células irradiadas a 10 Gy permanecían vivas, mientras que a 5 Gy la supervivencia era de un 44% (Fig. 23F). Tras 120 horas, en el cultivo de las poblaciones NK-92MI irradiadas a 5 y 10 Gy no quedaban células viables, mientras que las células irradiadas a 2,5 Gy y 3,75 Gy mantenían un porcentaje de supervivencia de 36 y 14%, respectivamente (Fig. 23F). La apoptosis celular se analizó por citometría de flujo mediante el marcaje con Anexina V (Fig. 23G). El porcentaje de células apoptóticas a 120h alcanzó alrededor del 90% en las células irradiadas a 5 y 10 Gy, mientras que la irradiación a 2,5 y 3,75 Gy inducía apoptosis en el 63 y 76% de células, respectivamente. Los resultados muestran que dosis de irradiación inferiores a la dosis clínica aprobada aumentan ligeramente la persistencia de las células NK-92MI NKG2D CAR in vitro.





**Figura 23. La irradiación a dosis clínicas de las células NK-92MI CAR anula su eficacia in vivo.**

A) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI y NK-92MI NKG2D CAR sin irradiar o 3h después de la irradiación (10Gy) frente a células U266 (n=3, media  $\pm$  SEM). B) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones sin tumor (vehículo) o infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK92MI NKG2D CAR o BCMA CAR irradiadas previamente a 10 Gy (n=3). Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión i.v. de  $4 \times 10^6$  células U266ffLucGFP seguida a los 7 días por infusiones i.v. semanales de  $1,6 \times 10^7$  células NK92MI CAR previamente irradiadas a 10 Gy. C) Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión i.v. de  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP seguida a las 48h por 3 infusiones i.v. de  $1 \times 10^7$  células NK92MI CAR previamente irradiadas a 10 Gy distanciadas cada 2-3 días. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones sin tumor (vehículo) o infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK92MI NKG2D CAR o BCMA CAR irradiadas previamente a 10 Gy (n=4). Imágenes de la carga tumoral monitorizada por bioluminiscencia (BLI) a los tiempos indicados en los ratones sin tumor (vehículo) o infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK92MI NKG2D CAR o BCMA CAR irradiadas previamente a 10 Gy. D) Análisis por citometría de flujo del porcentaje de las células NK-92MI CAR en muestras de SP extraídas a 3 y 48h post-infusión de la terapia (n=4, media  $\pm$  SEM) Se analizaron 2 ratones representativos de cada grupo CAR. E) Análisis por citometría de flujo a los tiempos indicados (0-120h) de la expresión de NKG2D-L en células NK-92MI NKG2D CAR irradiadas a distintas dosis (0-10Gy), n=3, media  $\pm$  SEM. F) Proliferación acumulativa de las células NK-92MI NKG2D CAR irradiadas a distintas dosis (0-10 Gy) a lo largo del tiempo (0-120h) medida por conteo de células vivas utilizando el método de exclusión con azul de tripán (n=3, media  $\pm$  SEM. G) Análisis por citometría de flujo a los tiempos indicados (0-120h) de la apoptosis de las células NK-92MI NKG2D CAR irradiadas a distintas dosis (0-10Gy) medida mediante el marcaje con Anexina-V, n=3, media  $\pm$  SEM.

### 3.2. Las dosis de irradiación en las células NK-92MI NKG2D CAR inferiores a la aprobada para uso clínico no aseguran el control de la proliferación in vivo

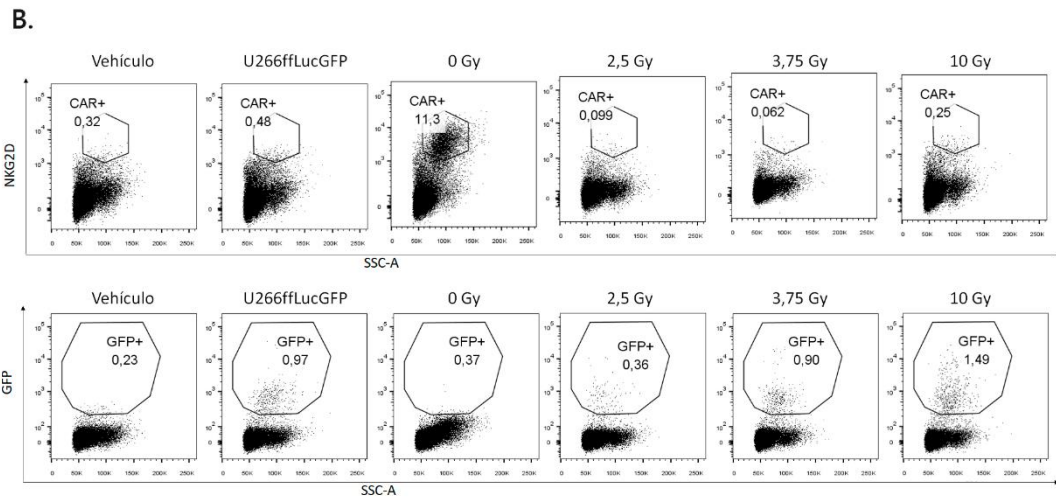
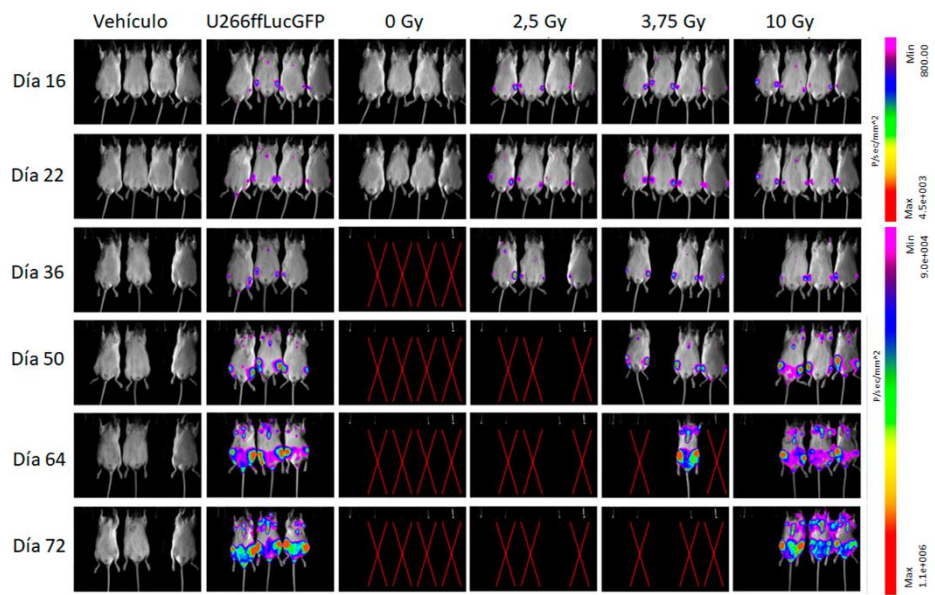
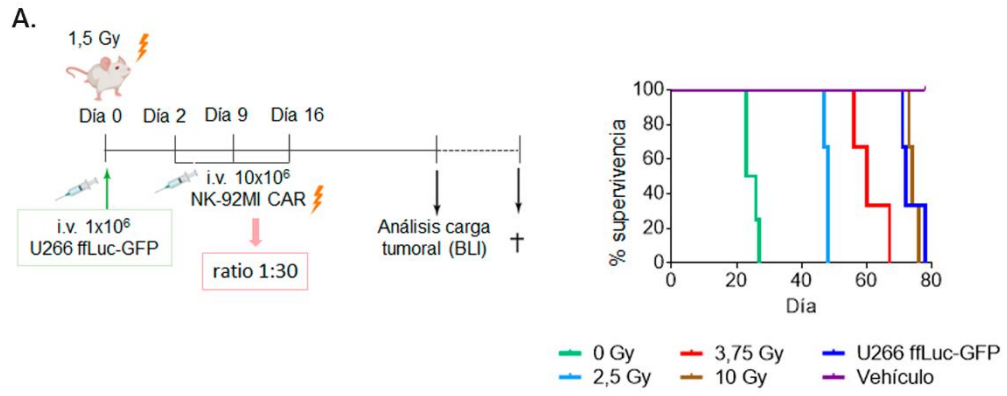
Basado en los resultados obtenidos en los experimentos in vitro que mostraban que con una irradiación de 10 Gy las células NK-92MI CAR sobreviven alrededor de 48 horas, pero las células irradiadas a menor dosis subsistían hasta una semana, quisimos ensayar in vivo las dosis de irradiación más bajas que pudieran aumentar ligeramente la supervivencia de las células sin comprometer la seguridad de la terapia. En este experimento se infundieron en los ratones  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP y, a las 48 horas, se administró el tratamiento NK-92MI NKG2D CAR, una dosis de  $10 \times 10^6$  una vez a la

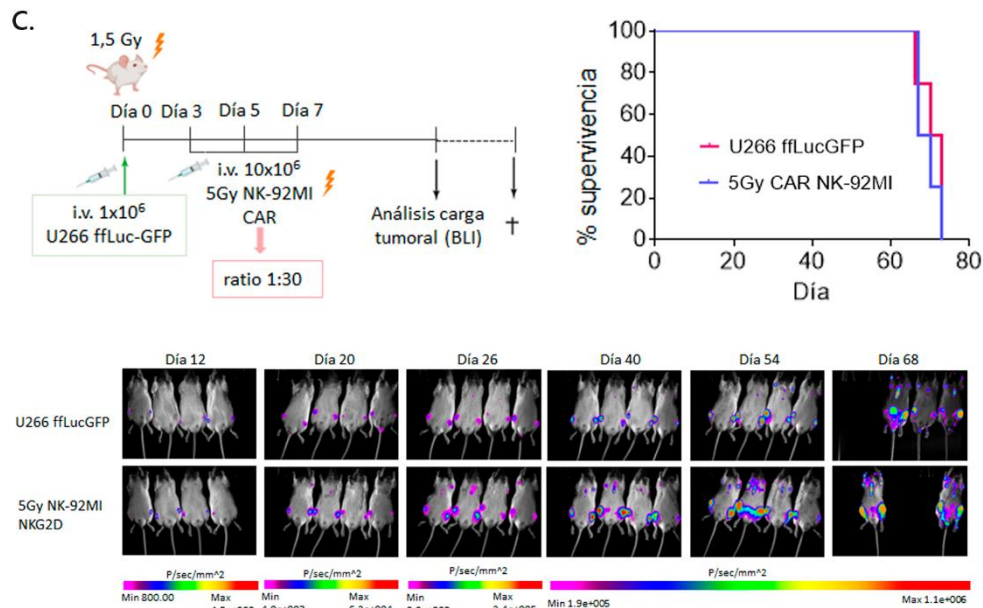
semana durante 3 semanas, tanto sin irradiar como irradiadas a 2,5 Gy, 3,75 Gy y 10 Gy. El seguimiento de la carga tumoral por bioluminiscencia (Fig. 24A) no detectó señal en el grupo de tratamiento NK-92MI sin irradiar (0Gy) 22 días después de su infusión. A pesar de la eficacia frente a MM observada, la supervivencia de este grupo fue de 24,5 días. De igual manera, murieron de manera temprana los ratones irradiados a dosis bajas de 2,5 Gy (48 días) y 3,75 Gy (60 días). La única dosis en la que los ratones no sucumbieron de forma prematura fue la de 10 Gy, aunque, al igual que en los experimentos anteriores, no mostró eficacia antitumoral frente al grupo U266ffLucGFP (74 días vs 72 días).

A punto final de los ratones tratados con células NK-92MI CAR sin irradiar, analizamos la MO y el bazo y pudimos corroborar que las células NK-92MI CAR habían proliferado causando la muerte temprana de los animales. Ese mismo día (día 27) sacrificamos aleatoriamente un ratón de cada grupo y aunque no detectamos células NK-92MI CAR en la MO de ningún ratón, cuantificamos una menor infiltración de células U266ffLucGFP en los grupos con irradiación inferior, que sugiere una mayor actividad antitumoral de la terapia a medida que disminuye la dosis de irradiación de estas células (Fig. 24B).

Liu y colaboradores [442] demostraron que las células NK-92MI CAR irradiadas a 5 Gy eran capaces de eliminar las células tumorales CD19<sup>+</sup> en su modelo in vivo utilizando dosis altas y tiempos cortos de infusión para promover la eficacia de las células NK-92MI CAR. Quisimos probar esta dosis de irradiación en nuestro modelo de MM acortando los tiempos entre infusiones, esta vez tres infusiones de  $10 \times 10^6$  células NK-92MI NKG2D CAR cada 48 h. Los resultados indican que las células NK-92MI CAR irradiadas a 5 Gy no eliminaban a los animales y no se detectaron células NK-92MI CAR en MO, en bazo ni en la SP de los ratones a punto final, pero no mostraron eficacia antitumoral bajo nuestro esquema de tratamiento (Fig. 24C). La supervivencia media del grupo control U266ffLucGFP fue de 71,5 días frente a los 68,5 días del grupo 5 Gy NK-92MI NKG2D CAR.

Los resultados anteriores sugieren que, al menos con los esquemas de tratamiento administrados en nuestros experimentos in vivo, no se han identificado dosis de irradiación de NK-92MI CAR que sean seguras y eficaces para el control del MM.





**Figura 24. Dosis de irradiación de NK-92MI CAR inferiores a la dosis clínica no consiguen controlar la proliferación de los efectores CAR in vivo.**

A) Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión i.v. de  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP seguida a las 48h por una infusión i.v. de  $10 \times 10^6$  células NK-92MI NKG2D CAR repetida semanalmente durante 3 semanas. Las células NK-92MI NKG2D CAR fueron previamente irradiadas a distintas dosis (0-10 Gy). Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones sin tumor (vehículo) o infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK-92MI NKG2D CAR irradiadas previamente a distintas dosis (0-10 Gy) (n=4). Imágenes de la carga tumoral monitorizada por biolumiscencia (BLI) a los tiempos indicados en los ratones sin tumor (vehículo) o infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK-92MI NKG2D CAR irradiadas previamente a distintas dosis (0-10 Gy). B) Gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de las células NK-92MI NKG2D CAR (panel superior) y U266ffLucGFP (panel inferior) en la MO de un ratón de cada grupo sacrificado aleatoriamente a día 27 tras la infusión de las células tumorales. C) Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión i.v. de  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP seguida a las 72h por 3 infusiones i.v. de  $1 \times 10^7$  células NK-92MI NKG2D CAR previamente irradiadas a 5 Gy distanciadas cada 2-3 días. Las células NK-92MI NKG2D CAR fueron previamente irradiadas a distintas dosis (0-10 Gy). Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK-92MI NKG2D CAR irradiadas previamente a 5 Gy (n=4). Imágenes de la carga tumoral monitorizada por biolumiscencia (BLI) a los tiempos indicados en los ratones infundidos con las células U266ffLucGFP sin tratamiento o tratados con NK-92MI NKG2D CAR irradiadas previamente a 5 Gy.

#### 4. LA MODIFICACIÓN GÉNICA DE LAS CÉLULAS NK-92MI CAR PARA QUE EXPRESEN UN INTERRUPTOR SUICIDA REGULA LA SUPERVIVENCIA DE LOS EFECTORES IN VITRO, PERO NO ES SUFICIENTE PARA CONTROLAR SU PROLIFERACIÓN IN VIVO

Como con la estrategia de reducir la dosis de irradiación de las células NK-92MI CAR no alcanzamos el objetivo previsto, con el fin de evitar la irradiación de las células NK-92MI CAR, quisimos expresar un interruptor suicida en estas células para poder controlar

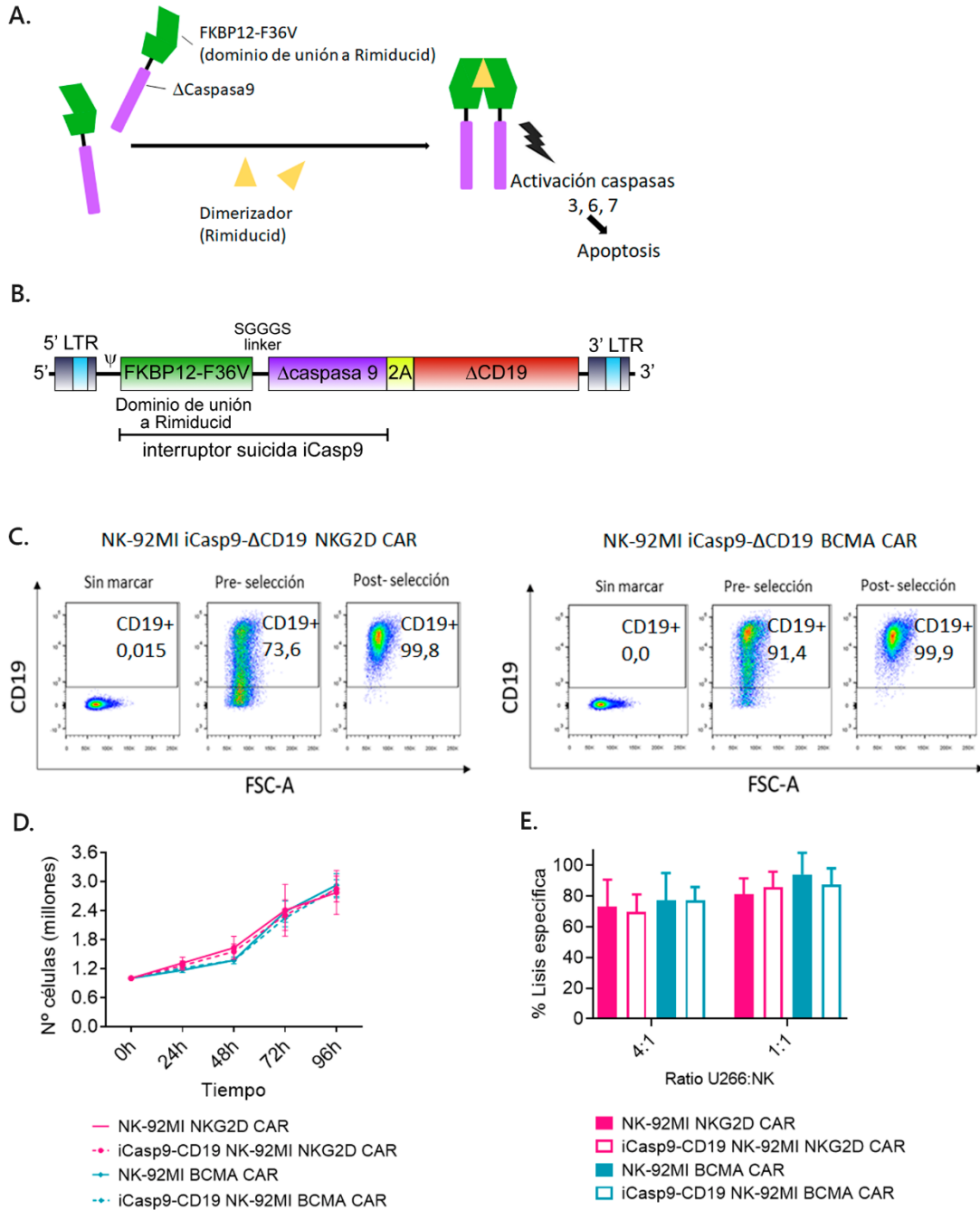
su proliferación in vivo. Este sistema consiste en la expresión de una caspasa 9 inducible (iCasp9), asociada con un dominio de unión a un dimerizador, AP1903 o Rimiducid [434]. En presencia del dimerizador, dos monómeros de iCasp9 se unen a una molécula de dimerizador y se desencadena una cascada de activación de las caspasas 3, 6 y 7, produciendo la apoptosis de la célula (Fig. 25A).

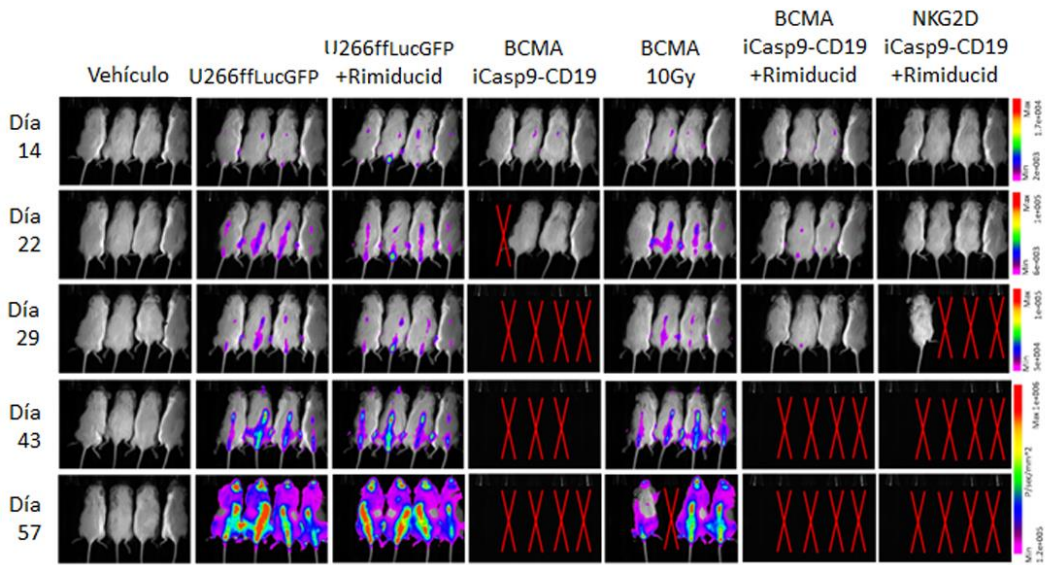
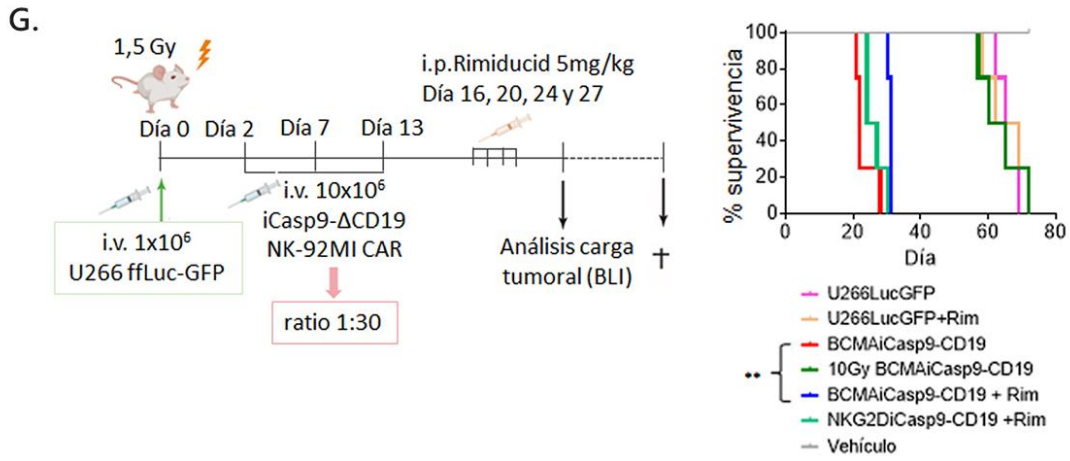
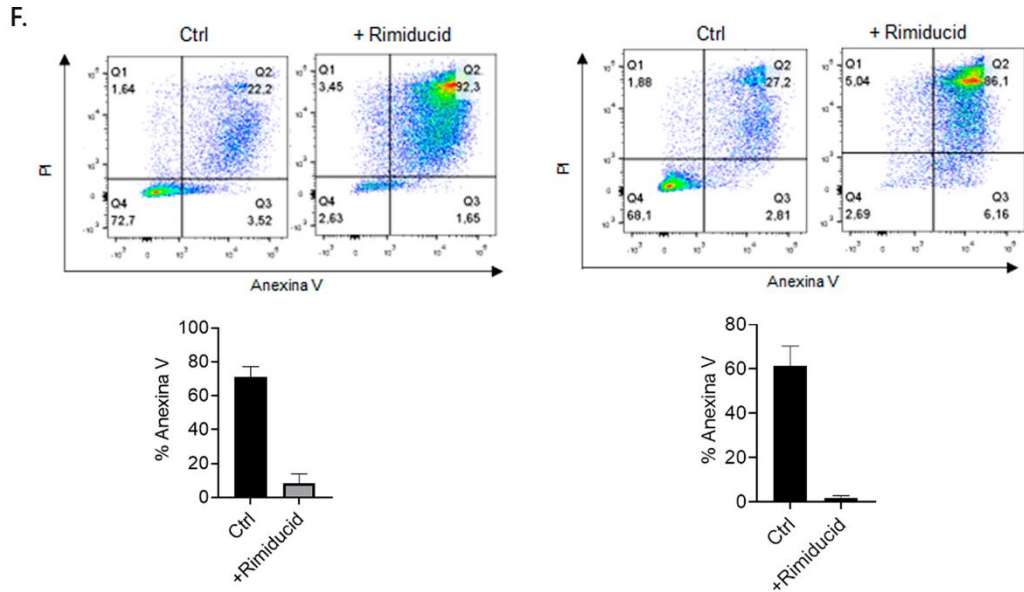
Llevamos a cabo la transducción gamma-retroviral de las células NK-92MI CAR con el constructo SFGiCasp9.2A. $\Delta$ CD19 (Fig. 25B), que contiene el receptor CD19 truncado para su selección por citometría de flujo. Las células que expresaban el interruptor suicida fueron seleccionadas por el marcador CD19 obteniendo una pureza cercana al 100% (Fig. 25C). Esta modificación genética no afectó ni a la proliferación de las células (Fig. 25D), ni a la capacidad citotóxica in vitro de las mismas (Fig. 25E).

Para asegurar la eficacia del interruptor suicida llevamos a cabo ensayos de apoptosis en presencia de rimiducid 100nM y observamos que tras 72h de tratamiento el 98% de las células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR habían entrado en apoptosis (Fig. 25F). Para evaluar esta estrategia en un modelo in vivo se injertaron las células U266ffLucGFP en ratones NSG y a los días 2, 7 y 13 se inyectó la terapia NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 NKG2D y BCMA CAR ( $10 \times 10^6$  células i.v.) sin irradiar, salvo el grupo control al que se le infundieron células irradiadas a 10Gy. Los días 16, 20, 24 y 27 se administró rimiducid 5mg/kg a los ratones que habían recibido células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR sin irradiar, para controlar su proliferación in vivo. La administración de rimiducid no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células de mieloma, ya que la supervivencia de los ratones U266ffLucGFP fue de 65 días frente a 65,6 días de los que además habían recibido rimiducid (U266ffLucGFP + rimiducid). Los ratones a los que se les había infundido células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 BCMA CAR irradiadas murieron al mismo tiempo que los ratones sin tratamiento (62,5 días 10Gy BCMA CAR). A diferencia de los resultados obtenidos en los ensayos in vitro, la administración de rimiducid 5mg/kg con nuestro esquema de tratamiento no consiguió controlar la proliferación de las células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR en los experimentos in vivo (Fig. 25G), ya que en la necropsia a punto final detectamos células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR en la MO de los ratones (Fig. 25H). Comparado con la supervivencia de los ratones a los que se les habían infundido células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 BCMA CAR sin irradiar (22 días), el grupo que recibió estas mismas células junto con infusiones de rimiducid consiguió aumentar la supervivencia 9 días (31 días,  $p=0,0069$ ), mientras que los que habían recibido NK-92MI

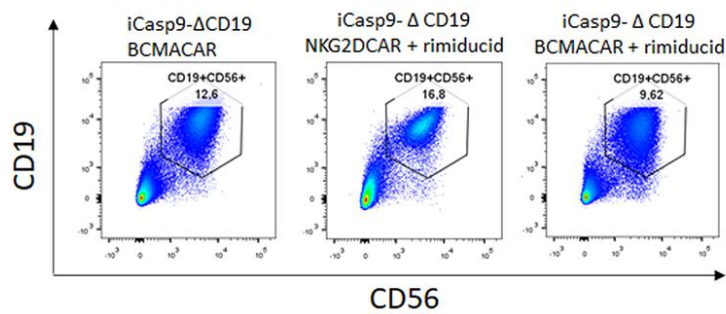


iCasp9- $\Delta$ CD19 NKG2D CAR + rimiducid mostraron una supervivencia solo 3,5 días superior (25,5 días,  $p=0,2286$ ).





H.



**Figura 25.** La expresión del interruptor suicida iCasp9- $\Delta$ CD19 en las células NK-92MI CAR permite conservar la potencia citotóxica *in vitro*, pero no consigue controlar la proliferación celular *in vivo*.

A) Esquema del interruptor suicida basado en una caspasa 9 inducible (iCasp9) con un dominio de unión a un dimerizador (AP1903 o rimiducid). B) Construido SFGiCasp9.2A. $\Delta$ CD19. C) Gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de las células NK-92MI NKG2D y BCMA CAR transducidas con el vector iCasp9- $\Delta$ CD19 y seleccionadas mediante citometría de flujo por la expresión de CD19. D) Ensayo de proliferación (0-96h) de las células NK-92MI CAR no modificadas o con expresión del interruptor suicida iCasp9- $\Delta$ CD19 mediante por conteo de células vivas utilizando el método de exclusión con azul de tripán. E) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI CAR modificadas o no con expresión del interruptor suicida iCasp9- $\Delta$ CD19 frente a células U266 (n=3, media $\pm$ SEM). F) Gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de la apoptosis en las células NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR tras el tratamiento con rimiducid 100nM durante 72h. La gráfica muestra la media  $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. G) Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión *i.v.* de  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP seguida a las 48h por 3 infusiones *i.v.* de  $5 \times 10^6$  células NK-92MI CAR no modificadas o con expresión del interruptor suicida iCasp9- $\Delta$ CD19 distanciadas cada 5 días. Los grupos de ratones a los que se les administró rimiducid 5mg/kg están indicados en cada caso. H) Gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de las células NK-92 iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR en muestras de MO a punto final de un ratón de cada grupo con terapia NK-92MI iCasp9- $\Delta$ CD19 CAR sin o con administración de rimiducid.

## 5. GENERACIÓN DE CÉLULAS NK CAR ACTIVADAS Y EXPANDIDAS PROCEDENTES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Para la generación de células NK de cordón umbilical CAR se purificaron y expandieron células NK obtenidas de sangre de cordón umbilical (CB-NK) y se transdujeron a los 7 días de expansión en cultivo con los lentivectores NKG2D 41BB-CD3 $\zeta$  y BCMA 41BB-CD3 $\zeta$  CAR anteriormente utilizados, a una MOI 10. Para el análisis de la transducción se empleó la siguiente estrategia de análisis (Fig. 26A): de todas las células se excluyeron los dobles y se analizaron las células vivas (DAPI negativas). A continuación, se seleccionaron las células NK (CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>), y dentro de esta población se analizó el porcentaje de células que expresaban el CAR correspondiente. Se obtuvo un porcentaje medio de transducción por citometría de flujo de  $67,32 \pm 4,86\%$  para el NKG2D CAR y de  $53,34 \pm 5,11\%$  para el BCMA CAR (Fig. 26B). Se analizó el porcentaje de células NK

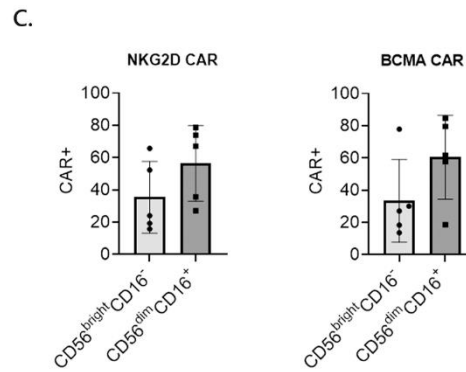
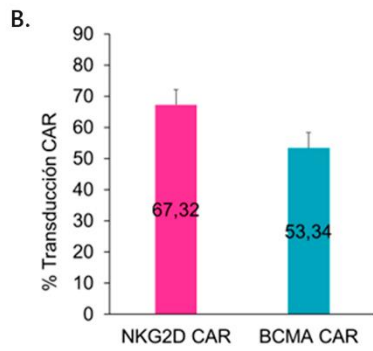
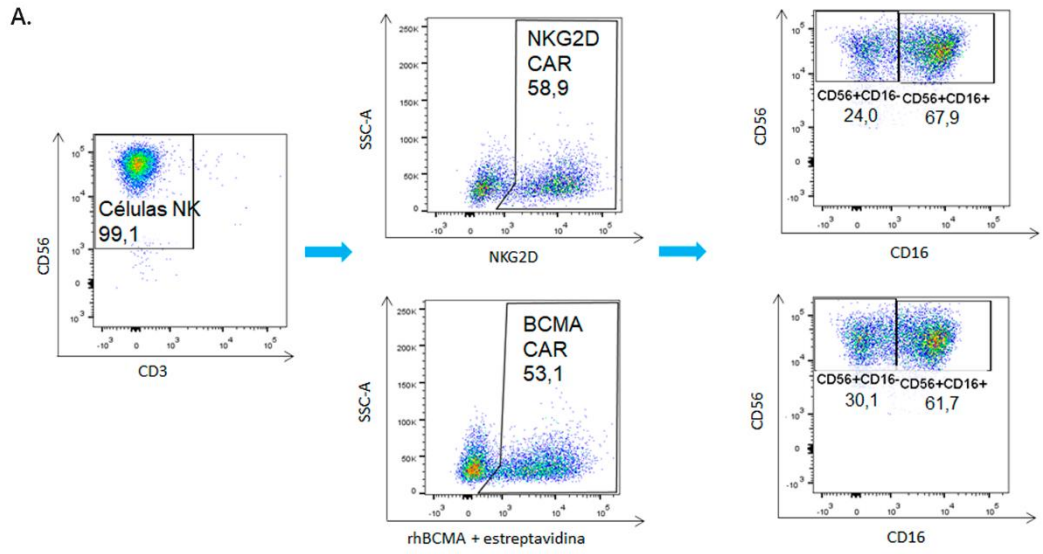
CAR citotóxicas (CD16<sup>+</sup>) (Fig. 26C). La integración de copias del vector en ambas poblaciones fue muy similar,  $1,37 \pm 0,02$  copias por célula de NKG2D CAR y  $1,21 \pm 0,15$  copias por célula de BCMA CAR (Fig. 26D). La expresión de ambas moléculas CAR se corroboró por *western blot*, se detectaron bandas de peso molecular correspondientes a los tamaños teóricos calculados (Fig. 26E).

Al igual que las células NK-92MI CAR, las células CB-NK CAR no mostraron hematotoxicidad *in vitro* frente a células mononucleadas de donantes sanos. El máximo porcentaje de lisis fue de un  $11,54 \pm 7,21\%$  a ratio 1:16 alcanzado con las células CB-NK sin transducir (Fig. 26F).

Adicionalmente, llevamos a cabo la cuantificación del IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cocultivo de las poblaciones efectoras con las células diana U266 (Fig. 26G), y observamos que la población CB-NK BCMA CAR producía significativamente más cantidad de IFN- $\gamma$  ( $1462,25 \pm 679,34$ pg/ml) que las células CB-NK sin transducir ( $52,2 \pm 13,07$  pg/ml) y CB-NK NKG2D CAR ( $676,34 \pm 395,21$  pg/ml).

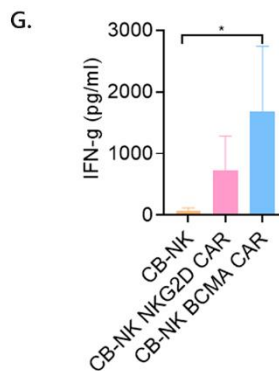
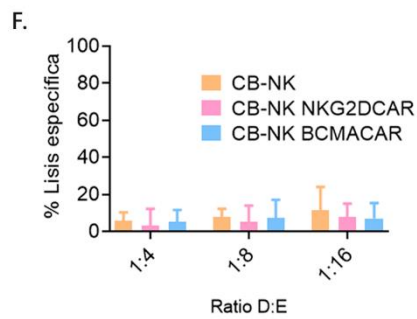
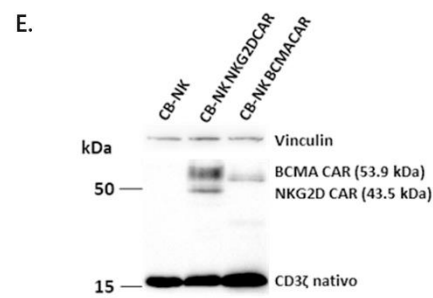
A continuación, quisimos estudiar la eficacia antitumoral de las células CB-NK CAR sobre células plasmáticas procedentes de 3 pacientes de MM, uno al diagnóstico (DX) y dos en el momento de recaída (R/R). Las características de estos pacientes se detallan en la *Tabla 8*. Tras la purificación de las células plasmáticas, se analizó por citometría de flujo la expresión de NKG2D-L y BCMA. Las células plasmáticas de todos los pacientes de MM expresaban los ligandos diana de las moléculas CAR estudiadas en las células plasmáticas de todos los pacientes de MM, aunque a niveles variables (Fig. 26H).

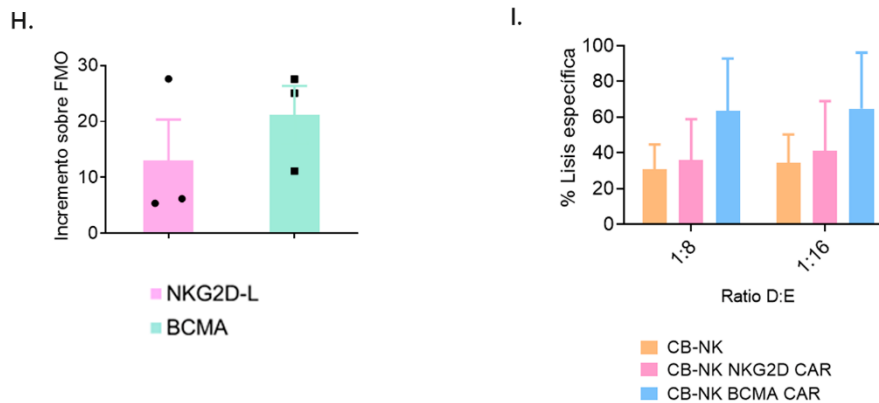
Para analizar la potencia citotóxica de esta inmunoterapia CAR sobre las células plasmáticas purificadas de pacientes de MM, llevamos a cabo un ensayo de citotoxicidad a 3 horas. Los resultados mostraron que la población CB-NK BCMA CAR presentaba una actividad antitumoral superior a la de las células CB-NK sin transducir ( $57,55 \pm 23,51\%$  vs  $27,03 \pm 14,27\%$  a ratio 1:16). Sin embargo, la población CB-NK NKG2D CAR presentaba una potencia más baja, aunque superior a la población CB-NK sin transducir ( $38,20 \pm 18,22\%$  vs  $27,03 \pm 14,27\%$  a ratio 1:16; Fig. 26I).



**D.**

Número de copias del vector (q-PCR)	
NKG2D CAR	1,37 ± 0,02 copias
BCMA CAR	1,21 ± 0,15 copias





**Figura 26. Generación y caracterización de células CB-NK CAR.**

A) Estrategia de análisis por citometría de flujo de las células CB-NK transducidas con los CAR NKG2D y BCMA. B) Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células CB-NK transducidas con los CAR NKG2D y BCMA (media ± SEM, n=5). C) Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células NK reguladoras (CD56<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) y citotóxicas (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) en las poblaciones CB-NK transducidas con los CAR NKG2D y BCMA (media ± SEM, n=5). D) Cuantificación mediante q-PCR del número de copias del vector en las células CB-NK transducidas con el CAR NKG2D o BCMA; E) Detección por western-blot de las moléculas CAR en las distintas poblaciones empleando el Ac anti-CD3ζ. F) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células CB-NK sin transducir o transducidas con el CAR NKG2D o BCMA frente a células mononucleadas de SP procedente de donantes sanos (n=3, media ± SEM). G) Cuantificación mediante citometría de flujo con el panel humano CD8/NK LEGENDplex™ del IFN-γ producido por las distintas células efectoras tras el cocultivo con la célula diana U266 (n=3, media ± SEM); H) Análisis por citometría de flujo de la expresión de NKG2D-L y BCMA en las células plasmáticas purificadas de las muestras de MO de pacientes de MM al diagnóstico (DX) y en recaída (R/R) (n=3, media ± SEM). I) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células CB-NK sin transducir o transducidas con el CAR NKG2D o BCMA frente a células plasmáticas primarias purificadas de muestras de MO de los pacientes de MM, descritos en la tabla 8 (n=3, media ± SEM). \*p<0,05.

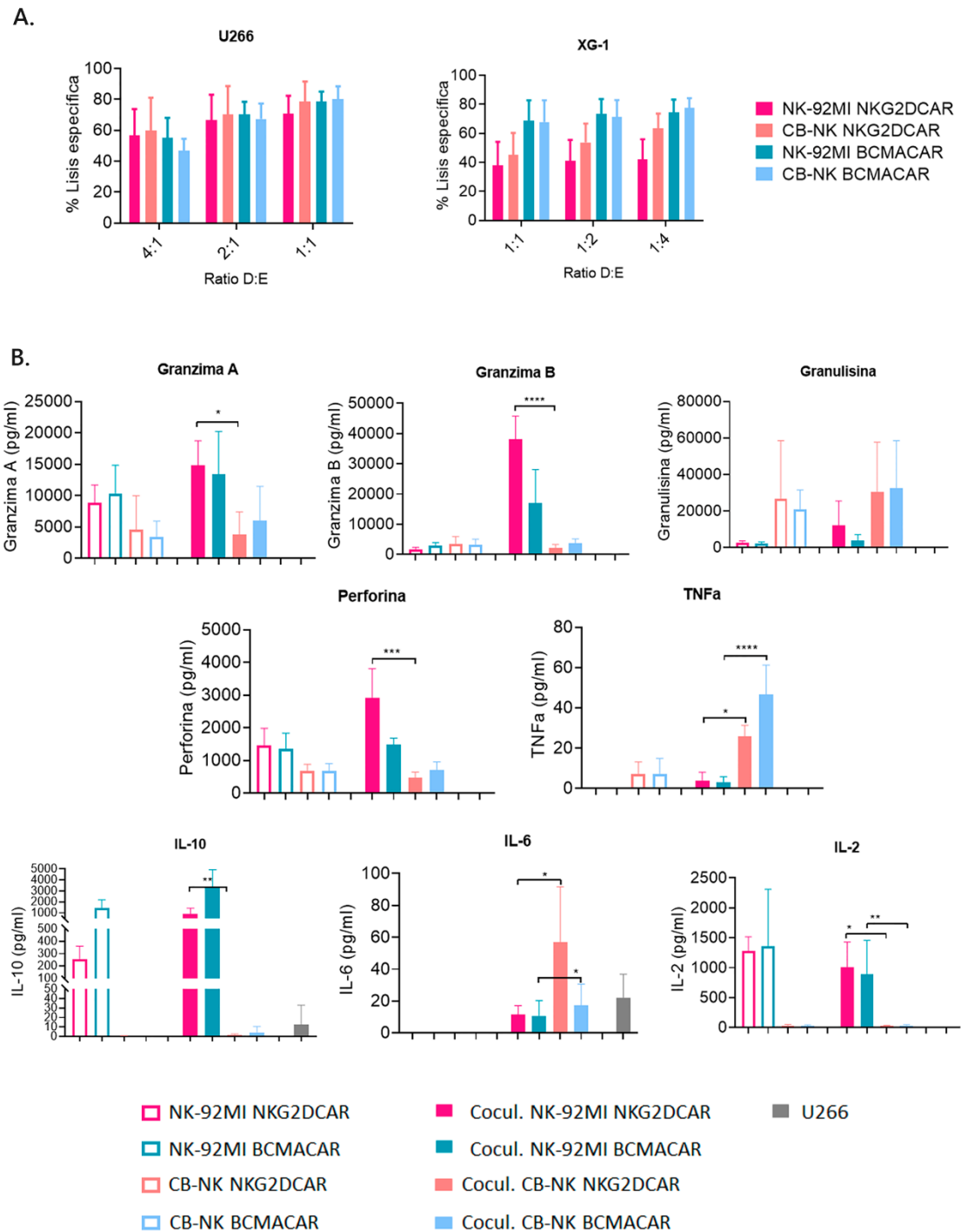
Nº	Edad	Momento	% CP	Tipo/ISS	Tratamiento	Isotipo	Expresión NKG2D-L	Expresión BCMA
#1	65	R/R	9	IIIA	Kd (2ª línea)	kappa	6,2	11,1
#2	88	DX	51	IIB	-	IgA kappa	5,4	25,1
#3	60	R/R	37	IIIA	VD + Venetoclax (EC)	IgG kappa	27,5	27,6

**Tabla 8. Características de los pacientes de MM al diagnóstico o en recaída.**

R/R: recaída; DX: diagnóstico; CP: células plasmáticas analizadas por citometría de flujo; K, carfilzomib; d, dexametasona; V, velcade (bortezomib); D, daratumumab; EC, ensayo clínico.

### 5.1. Los efectores alogénicos NK-92MI CAR y CB-NK CAR presentan similar potencia citotóxica in vitro frente a MM

Una vez generadas las células CB-NK CAR analizamos su potencia citotóxica frente a líneas celulares de MM, comparándola con la potencia de las células NK-92MI CAR en un ensayo de citotoxicidad a 3h (Fig. 27A). La lisis específica obtenida frente a la línea celular U266 a ratio 1:1 fue de  $71 \pm 11,4\%$  para la población NK-92MI NKG2D CAR frente a un  $78,7 \pm 12,9\%$  para la población CB-NK NKG2D CAR ( $p > 0,999$ ). La lisis obtenida a igual ratio para la población NK-92MI BCMA CAR fue de  $78,7 \pm 6,33\%$  frente a un  $80,2 \pm 8,35\%$  para la población CB-NK BCMA CAR ( $p > 0,999$ ). El porcentaje de lisis específica obtenida frente a la línea celular XG-1 a ratio 1:1 fue de un  $37,7 \pm 16,6\%$  para la población NK-92MI NKG2D CAR respecto a un  $45,3 \pm 15,0\%$  para la población CB-NK NKG2D CAR ( $p > 0,999$ ). Mientras que la lisis obtenida para la población NK-92MI BCMA CAR fue de  $68,6 \pm 14,2\%$  comparado con un  $67,8 \pm 15,0\%$  para la población CB-NK BCMA CAR ( $p > 0,999$ ). Estos resultados mostraban que no había diferencias significativas en la eficacia antitumoral in vitro de ambos tipos de efectores alogénicos CAR. Asimismo, se cuantificó también la concentración de citoquinas solubles y proteínas citotóxicas liberadas al sobrenadante tras el cocultivo de las poblaciones efectoras con la línea celular de MM U266 (Fig. 27B). Los resultados mostraron una mayor liberación de perforina, granzima A y granzima B por parte de las células NK-92MI CAR en comparación con las células CB-NK CAR, mientras que estas últimas producían más TNF $\alpha$ . Además, se cuantificó una mayor concentración de IL-10 en los sobrenadantes de las células NK-92MI CAR, y de IL-6 en los sobrenadantes correspondientes a las células CB-NK CAR (Fig. 27B).



**Figura 27.** La actividad citolítica in vitro de las células NK-92MI CAR frente a líneas celulares de MM es similar a la de las células CB-NK CAR.

A) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI CAR y CB-NK CAR frente a líneas de MM (n=3, media ± SEM). B) Cuantificación de citoquinas solubles y proteínas citotóxicas liberadas al sobrenadante por las células efectoras tanto en monocultivo, como tras el cocultivo con la diana U266 analizado mediante citometría de flujo con el panel humano CD8/NK LEGENDplex™ (n=3, media ± SEM). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.



## 5.2. Comparación de la eficacia in vivo de los distintos efectores alogénicos: NK-92 CAR vs CB-NK CAR

Como en los experimentos previos observamos que las células NK-92MI CAR no tenían eficacia in vivo tras la irradiación a la dosis clínica de 10Gy (Fig. 24), quisimos evaluar la potencia citotóxica de las células NK-92 dependientes de IL-2, que son menos sensibles a la irradiación [318]. Estas células se transdujeron con los CAR NKG2D y BCMA siguiendo el mismo procedimiento que en las NK-92MI, a MOI 10, y fueron posteriormente seleccionadas obteniendo finalmente transducciones estables con una pureza en la población cercana al 100% de células CAR<sup>+</sup> (Fig. 28A). En cuanto a la integración del vector, de nuevo alcanzó valores muy similares entre poblaciones:  $0,65 \pm 0,01$  copias por célula correspondiente al NKG2D CAR y  $0,83 \pm 0,02$  copias por célula en el caso del BCMA CAR (Fig. 28B). No hubo diferencias significativas en la comparación in vitro de la capacidad citotóxica de las células NK-92 CAR frente a las NK-92MI CAR (Fig. 28C).

A continuación, realizamos un ensayo in vivo infundiendo ratones NSG con  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP. A las 48h se le administraron los tratamientos correspondientes según el esquema que se muestra en la Fig. 28D. En el caso de las células NK-92 CAR, se administraron  $10 \times 10^6$  células por infusión los días 2, 5 y 9; mientras que las células CB-NK CAR se administraron en dosis de  $15 \times 10^6$  células los días 2 y 9, un total de  $30 \times 10^6$  células en todos los casos.

Para evaluar la persistencia en circulación de ambos efectores CAR se llevó a cabo la extracción de SP de los animales 7 días después de la infusión de la terapia y las células procedentes de la SP de los ratones se analizaron por citometría de flujo. Mientras que los valores detectados de NK-92 CAR irradiadas apenas alcanzaban el  $0,007 \pm 0,001\%$  en SP, corroborando los resultados obtenidos con células NK-92MI CAR, las células CB-NK CAR seguían circulando en la sangre de los ratones 7 días después de su infusión. La infiltración media en SP de las células CB-NK NKG2D CAR fue de  $0,12 \pm 0,02\%$ , y de las CB-NK BCMA CAR fue de  $0,21 \pm 0,05\%$  (Fig. 28F).

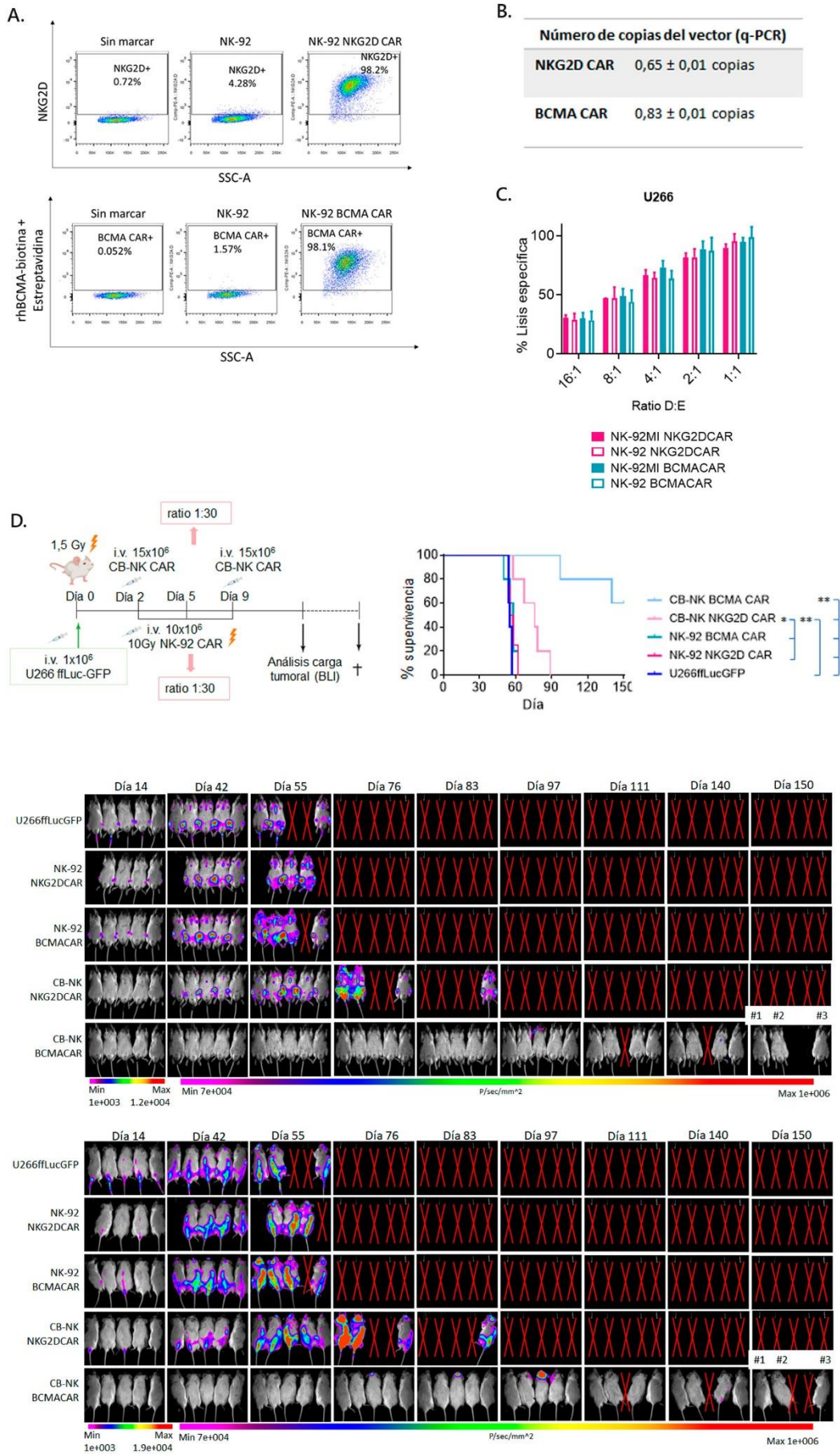
En el momento de la necropsia del último ratón U266ffLucGFP sacrificado (día 57) se realizó una prueba de Rayos X a un ratón representativo de cada grupo para evaluar el desarrollo de lesiones líticas alcanzado. Mientras que en los ratones U266ffLucGFP sin tratamiento y los que recibieron la terapia NK-92 NKG2D y NK-92 BCMA CAR se

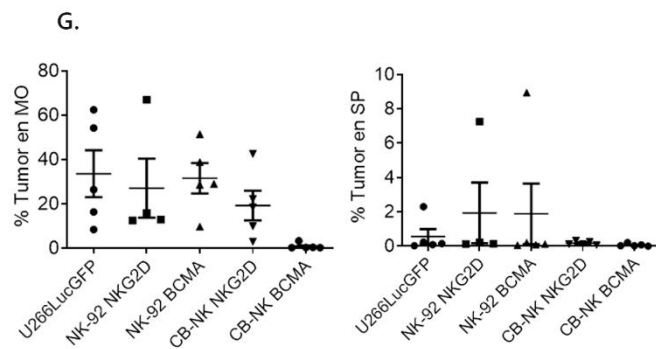
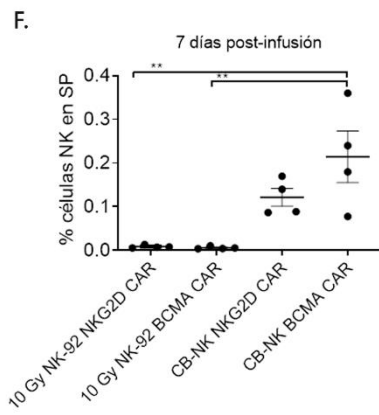
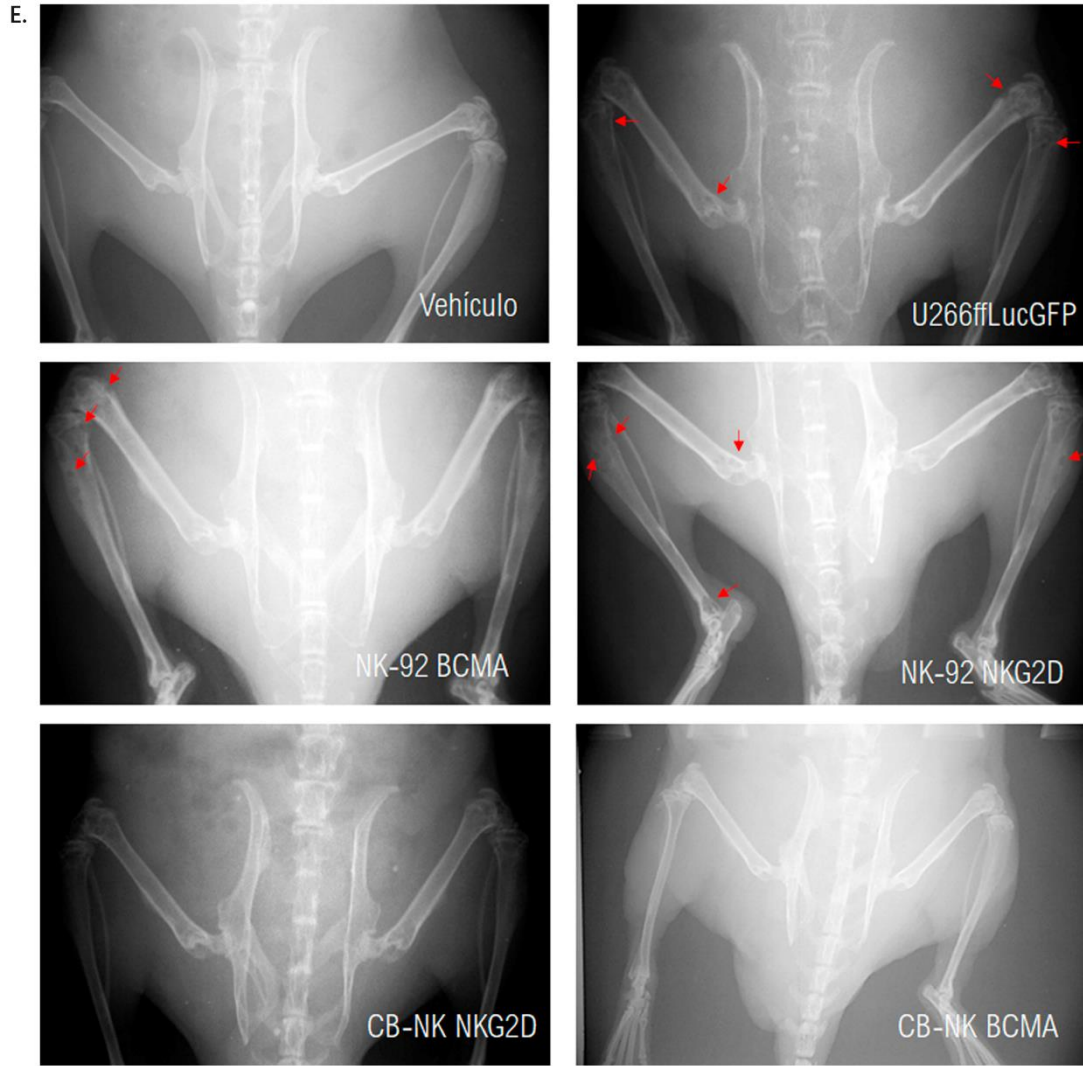
pueden apreciar lesiones líticas, los ratones que recibieron la terapia CB-NK NKG2D y BCMA CAR no habían desarrollado hasta el momento de la necropsia lesiones líticas detectables (Fig. 28E).

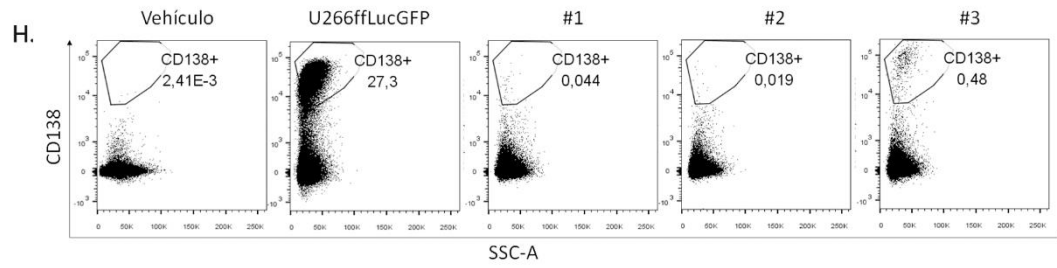
En este modelo, la supervivencia media de los ratones U266ffLucGFP fue de 55 días, comparado con los que recibieron la terapia NK-92 NKG2D CAR o NK-92 BCMA CAR que no alcanzaron diferencias significativas (56,5 o 58 días de supervivencia, respectivamente). Sin embargo, la terapia con las células CB-NK CAR permitió alcanzar respuestas en 9/10 de los ratones. En el caso de los ratones que recibieron células CB-NK NKG2D CAR la supervivencia media fue de 76 días ( $p=0,0025$  frente al control U266, 55 días), mientras que 3 de los 5 ratones que recibieron el tratamiento CB-NK BCMA CAR no mostraron signos clínicos de enfermedad ni señal por biolumiscencia al menos hasta día 150, momento en el que se discontinuó el experimento. En ese punto, se analizó la MO de los ratones supervivientes sacrificados, #1 (392 CP en  $9,14 \times 10^5$  eventos viables), en el ratón #2 (204 CP en  $1,09 \times 10^6$  eventos viables analizados) y en el ratón #3 (4879 CP en  $1,05 \times 10^6$  eventos viables) (Fig. 28H). La infiltración media de las células tumorales en la MO de los ratones del grupo CB-NK BCMA CAR a la necropsia es mínima en comparación con la del resto de grupos (Fig. 28G, izquierda). El análisis en SP de las células U266 refleja una mínima circulación de las células de MM en SP (Fig. 28G, derecha). El análisis histológico muestra la infiltración de células tumorales en la MO del fémur y en el tejido hepático de los ratones infundidos con U266ffLucGFP sin tratamiento, mientras que en los ratones #1, #2 y #3 del grupo CB-NK BCMA CAR no se aprecia desorganización o alteración de las poblaciones residentes de estos tejidos (Fig. 28I).

A continuación, se estudió la compatibilidad KIR-HLA entre la línea celular de MM U266 y las células CB-NK de los distintos donantes, reclutados de forma aleatoria, y su posible impacto en la respuesta a la terapia. Los resultados revelaron que las células CB-NK de los donantes utilizados para este experimento se encontraban inhibidas solo por una interacción de inhibición KIR-HLA (*match*) (Tabla 9).

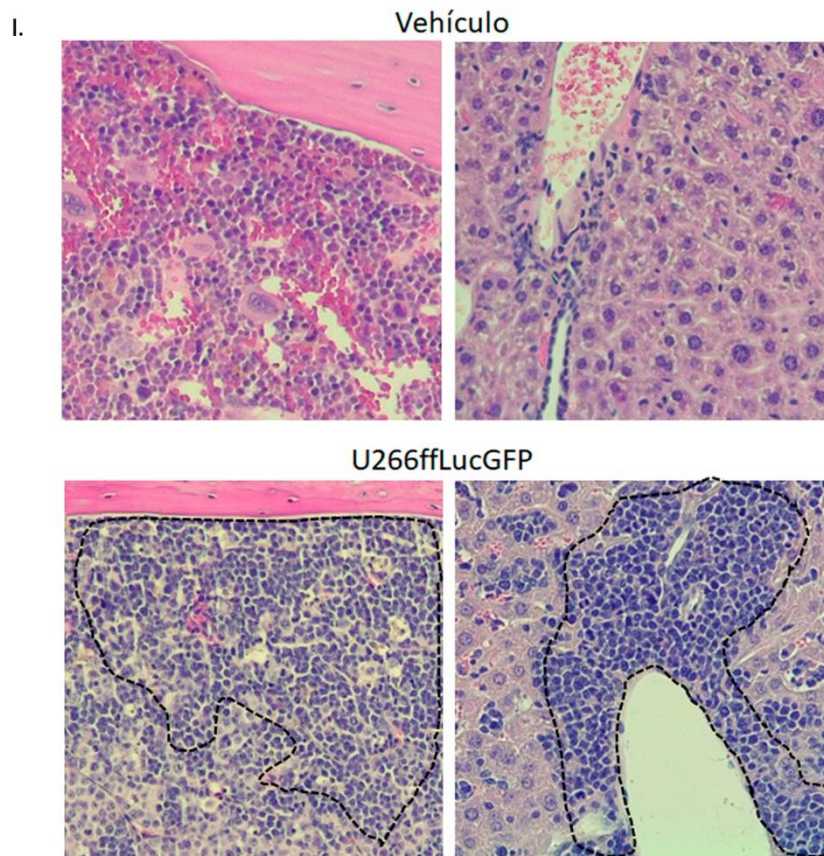
Los datos obtenidos de estos estudios muestran que, al igual que las células NK-92MI CAR, las células NK-92 CAR tampoco presentan eficacia anti-MM in vivo. Sin embargo, ambas poblaciones CB-NK CAR poseen actividad antitumoral para retrasar significativamente el desarrollo de la enfermedad, aunque las respuestas alcanzadas con la terapia con células CB-NK BCMA CAR resultaron más persistentes.

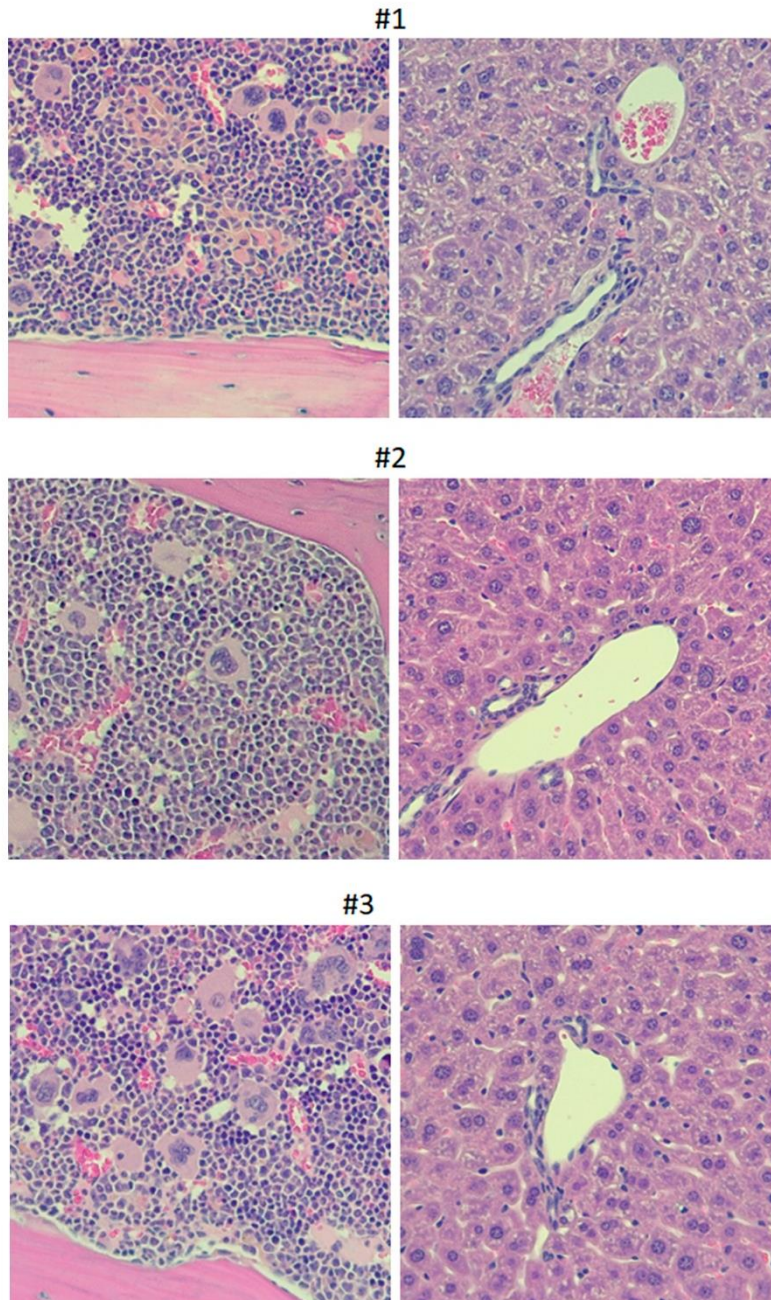






Ratón	% CP	Nº CP	Nº eventos viables
Vehículo	0,002	4	1,66x10 <sup>6</sup>
U266ffLucGFP	26,3	30107	1,09x10 <sup>6</sup>
#1	0,044	392	9,14x10 <sup>5</sup>
#2	0,019	204	1,09x10 <sup>6</sup>
#3	0,48	4879	1,05x10 <sup>6</sup>





**Figura 28.** Las células CB-NK BCMA CAR superan en eficacia anti-MM a las células CB-NK NKG2D CAR.

A) Gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de las células NK-92 transducidas con los CAR NKG2D y BCMA. B) Cuantificación mediante q-PCR del número de copias del vector por célula en las poblaciones NK-92 transducidas con el CAR NKG2D o BCMA. C) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92 CAR y NK-92MI CAR frente a las células U266 (n=3, media  $\pm$  SEM). D) Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión i.v. de  $1 \times 10^6$  células U266ffLucGFP seguida por 3 infusiones i.v. de  $1 \times 10^7$  células NK92 CAR previamente irradiadas a 10 Gy a días 2, 5 y 9 o por 2 infusiones i.v. de  $1,5 \times 10^7$  células CB-NK CAR a días 2 y 9. Curva de supervivencia Kaplan-Meier (n=5). La significación entre los distintos grupos se muestra en el panel derecho. E) Detección mediante rayos X de las lesiones líticas en el momento de la necropsia del último ratón U266ffLucGFP sacrificado. F) Detección del % de células NK-92 CAR y CB-NK CAR en SP 7 días posteriores a la infusión de la

terapia (n=4). G) Detección del % de células en MO (izquierda) y SP (derecha) tras la necropsia (n=5). H) Representación del número de células mielomatosas halladas en la MO de los ratones #1, #2, y #3 correspondientes al grupo CB-NK BCMA CAR sacrificados a día 150, y representación de un ratón vehículo y un control U266ffLucGFP. I) Corte de tejido, a la izquierda MO, a la derecha hígado, de los ratones #1, #2, y #3 correspondientes al grupo CB-NK BCMA CAR sacrificados a día 150, y de un ratón vehículo y un control U266ffLucGFP. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio óptico a un aumento de 20x.

HLA donante 1	2DL1 (ligando: HLA-C2)	2DL2/2DL3 (ligando: HLA-C1)	3DL1 (ligando: HLA-Bw4)
C2	mismatch		
C1/C2		match	
Bw4			-

HLA donante 2	2DL1 (ligando: HLA-C2)	2DL2/2DL3 (ligando: HLA-C1)	3DL1 (ligando: HLA-Bw4)
C2	mismatch		
C1/C2		match	
Bw4			mismatch

**Tabla 9.** Estudio de la compatibilidad KIR-HLA entre la línea celular de MM U266 y las células CB-NK de los donantes utilizados en el experimento in vivo anterior.

## 6. EL PRETRATAMIENTO CON BTZ+GSI DE CÉLULAS DE MM RESISTENTES A BTZ POTENCIA LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL CAR NKG2D

Como habíamos observado que la terapia CB-NK NKG2D CAR producía respuestas limitadas, tal y como se había observado con las células T CAR NKG2D [253], estudiamos posibles combinaciones con fármacos que puedan incrementar la inmunogenicidad de las células de MM para rescatar la terapia con células CB-NK NKG2D CAR, a través del incremento de ligandos de estrés, NKG2D-L, en un modelo de resistencia a BTZ e inmunoterapias anti-BCMA.

Para mimetizar este escenario de resistencia a terapias anti-BCMA, suprimimos la expresión de BCMA en una línea celular de MM, ARP1, mediante el sistema CRISPR/Cas9 para generar la línea celular ARP1 BCMA<sup>KO</sup> (denominada de aquí en adelante ARP1 KO) (Fig. 29A). Posteriormente, se indujo la resistencia a BTZ de esta línea celular mediante exposición gradual a concentraciones subletales crecientes de BTZ.

Junto con esta línea celular resistente, en este trabajo se utilizaron dos líneas celulares de MM resistentes a BTZ que habían sido previamente caracterizadas. La línea celular RPMI 8226 R7 (en adelante abreviada como RPMI R7) contiene una mutación que afecta a la subunidad catalítica PSMB5, por lo que la inhibición del proteasoma por BTZ está bloqueada [432]. En cambio, la línea celular NCI H929 R20 (en adelante abreviada como NCI R20) no presenta mutaciones en la secuencia que codifica para el dominio de unión a BTZ.

A continuación, estudiamos posibles mutaciones en el gen PSMB5 en la línea celular resistente generada en el laboratorio, ARP1 KO R16. Tras la búsqueda de similitudes utilizando la herramienta BLAST (NCBI), el análisis mutacional reveló que no existen mutaciones en el gen PSMB5.

Posteriormente, analizamos de forma indirecta la actividad del proteasoma mediante el estudio por *western blot* de la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas. Los resultados muestran que en las células parentales NCI H929, ARP1 KO y RPMI-8226 se produce una acumulación de formas poliubiquitinadas tras el tratamiento durante 24h con BTZ (Fig. 29B). La combinación BTZ+GSI potencia la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas en células resistentes al mismo nivel que en las células sensibles tras el tratamiento con BTZ en monoterapia. En el caso de las células RPMI R7, que tienen una mutación que afecta a la subunidad catalítica de unión a BTZ, la actividad del proteasoma no se puede inhibir (Fig. 29B).

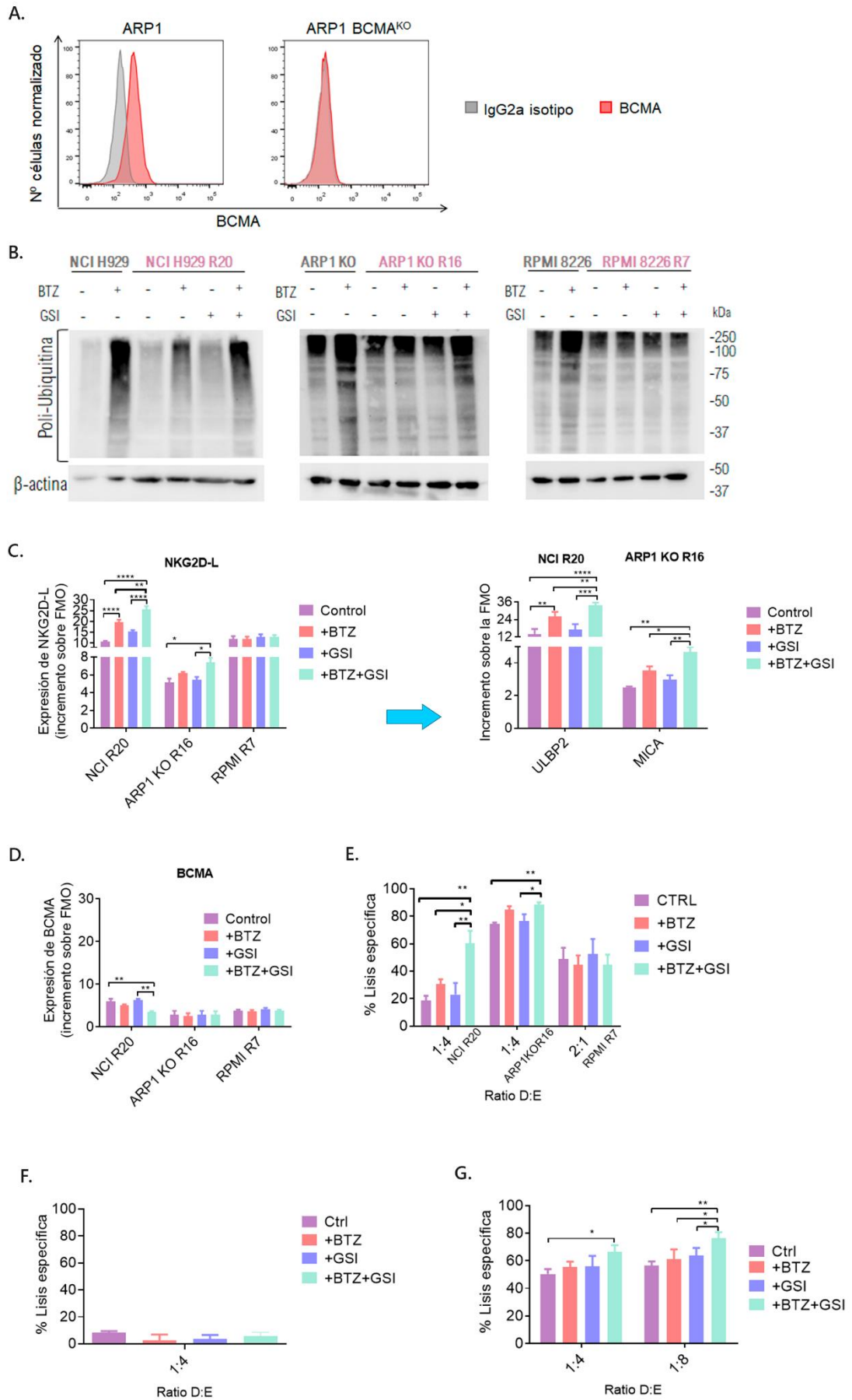
Se ha descrito que la inhibición del proteasoma por BTZ induce la sobreexpresión de los NKG2D-L en líneas celulares de MM sensibles, pero no se ha estudiado en células resistentes a este fármaco. De esta forma, quisimos analizar el efecto de la combinación BTZ+GSI sobre la expresión de NKG2D-L y BCMA en las células resistentes a BTZ NCI R20, ARP1 KO R16 y RPMI R7. Mientras que la expresión de BCMA no varió en ninguna de las células analizadas (Fig. 29D), la expresión de NKG2D-L aumentó significativamente en las células NCI R20 y ARP1 KO R16 tras el tratamiento con la combinación con BTZ+GSI (Fig. 29C, izquierda). Este efecto se asoció con la inhibición de la actividad del proteasoma, porque en células con mutaciones en PSMB5 (células RPMI R7) que impiden su inhibición por BTZ, la combinación BTZ+GSI no incrementó la expresión de NKG2D-L (Fig. 29C). Posteriormente, quisimos identificar en cada línea celular los ligandos inducidos tras el tratamiento BTZ+GSI (Fig. 29C, derecha). En el



caso de NCI R20, el ligando que incrementaba su expresión era ULBP2, mientras que en las células ARP1 KO R16 se sobreexpresaba MICA.

Con el fin de estudiar si este aumento de expresión de NKG2D-L tras el tratamiento con BTZ+GSI sensibilizaba las células tumorales resistentes a la actividad tumoral de células NK que expresan el CAR NKG2D, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad frente a las líneas resistentes NCI R20, ARP1 KO R16 y RPMI R7 previamente tratadas. El tratamiento de las células RPMI R7 con BTZ o GSI en monoterapia o en combinación no incrementó significativamente la actividad citotóxica de las células NK-92MI NKG2D CAR (Fig. 29E). Sin embargo, esta actividad antitumoral se vio potenciada frente a las células resistentes NCI R20 y ARP1 KO R16 pretratadas con los fármacos BTZ + GSI en comparación con las células sin tratar (a ratio 1:4  $58,87 \pm 6,09\%$  vs  $26,76 \pm 5,01\%$  en la línea NCI R20;  $88,51 \pm 1,64\%$  vs  $74,47 \pm 0,87\%$  en la línea ARP1 KO R16; Fig. 29E). El tratamiento con células NK-92MI NKG2D CAR sobre células PBMCs de donantes sanos previamente tratadas durante 24h con la combinación BTZ+GSI a las dosis anteriores no provocó toxicidad hematológica (Fig. 29F).

La combinación BTZ+GSI también potenció la actividad antitumoral de las células CB-NK NKG2D CAR sobre las células resistentes que habían sido pretratadas con BTZ+GSI en comparación con las células sin tratamiento ( $76,34 \pm 4,34\%$  vs  $56,65 \pm 3,5\%$  a ratio 1:8,  $p=0.021$ ; Fig. 29G).



**Figura 29. El pretratamiento con la combinación BTZ+GSI potencia la inhibición de proteasoma, aumenta la expresión de ligandos de NKG2D y sensibiliza a la terapia NKG2D CAR a las líneas de MM resistentes a BTZ.**

A) Histograma representativo del análisis por citometría de flujo de la expresión de BCMA tras la supresión de su expresión en la línea celular de MM ARP1 mediante edición génica CRISPR/Cas9. B) Detección por western-blot de la expresión de proteínas poliubiquitinadas empleando el Ac anti-ubiquitina en líneas de MM resistentes a BTZ. C) Análisis por CMF de la expresión de NKG2D-L en pool (a la izquierda) y de manera individual (a la derecha) sobre líneas de MM resistentes a BTZ. D) Análisis por CMF de la expresión de BCMA sobre líneas de MM resistentes a BTZ. E) Actividad citotóxica a 3h de las células NK-92MI NKG2D CAR frente a líneas de MM resistentes a BTZ (n=3, media  $\pm$  SEM). F) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células NK-92MI NKG2D CAR frente a células mononucleadas de SP procedente de donantes sanos tratadas con BTZ (20nM) y GSI (100  $\mu$ M) (n=3, media  $\pm$  SEM). G) Lisis específica analizada mediante ensayos de liberación de calceína en el cocultivo durante 3 h de las células CB-NK NKG2D CAR frente a líneas de MM resistentes a BTZ (n=3, media  $\pm$  SEM). Todos los tratamientos con BTZ (20, 16 o 7 nM) y/o GSI (100 $\mu$ M) se llevaron a cabo durante 24h. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*<0,0001.

### 6.1. El tratamiento BTZ+GSI en células de MM resistentes a BTZ se asocia con la acumulación y la respuesta al daño en el ADN

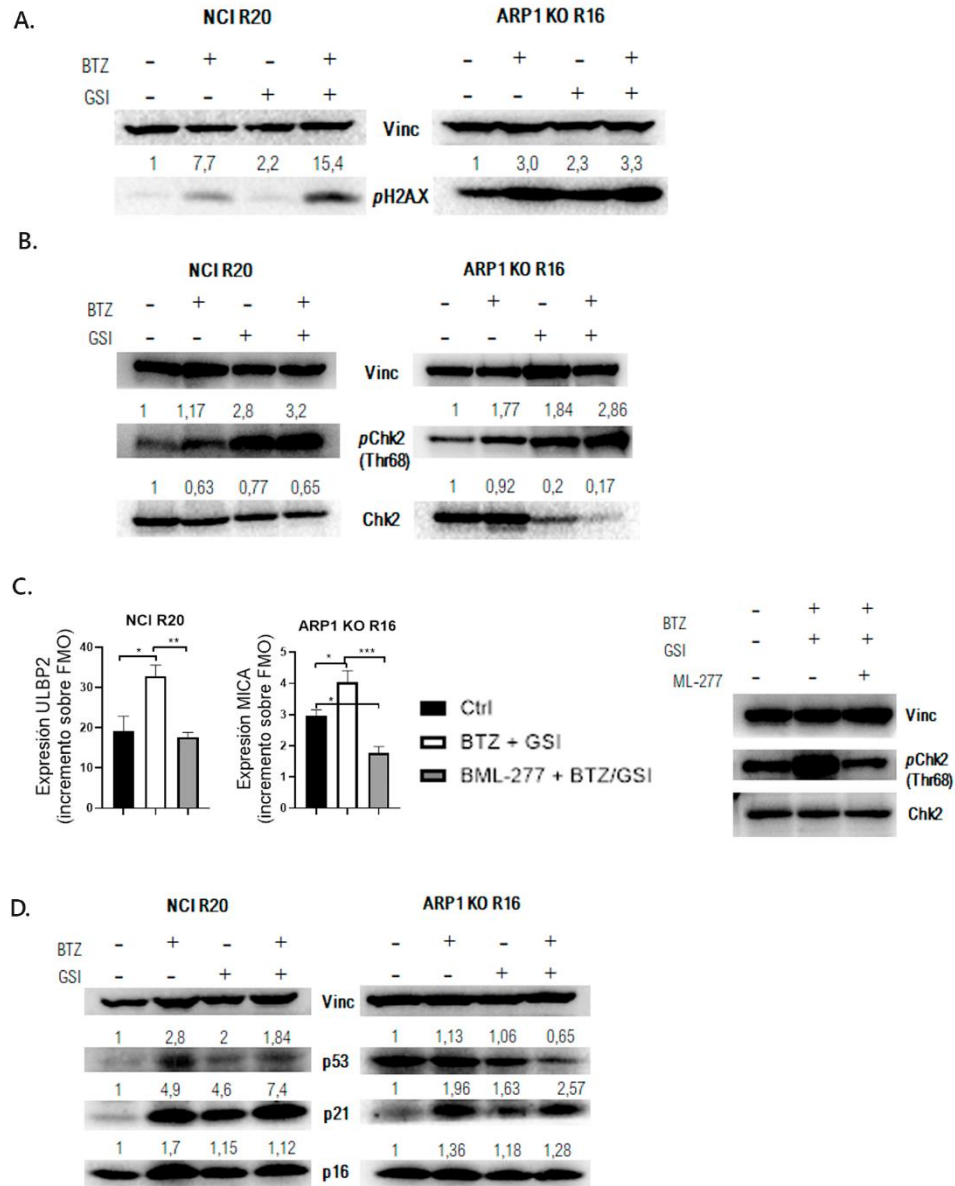
Quisimos investigar los mecanismos responsables de la sobreexpresión de los NKG2D-L tras el tratamiento combinado con BTZ+GSI en las líneas celulares resistentes a bortezomib NCI R20 y ARP1 KO R16.

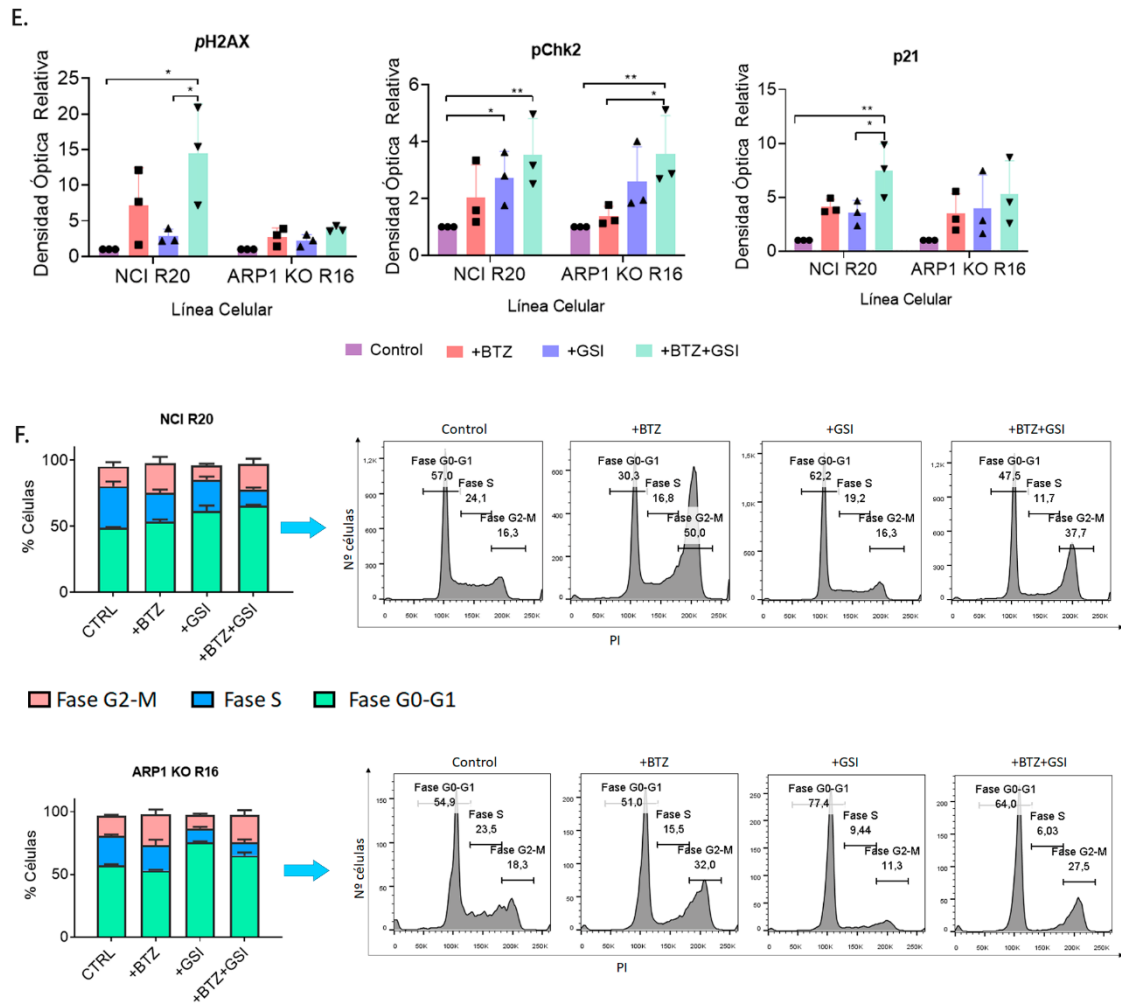
En primer lugar, estudiamos si la combinación BTZ+GSI inducía la fosforilación de H2AX (*p*-H2A.X), marcador de daño genotóxico en el ADN por dobles roturas. El tratamiento durante 24h con BTZ+GSI aumentaba la fosforilación de H2AX por encima de los niveles alcanzados con BTZ en monoterapia (Fig. 30 A, E). Analizamos también la activación de Chk2 que es la principal diana de la quinasa ATM implicada en la señalización en la respuesta a daño en el ADN, mediante la fosforilación en la treonina 68. Los niveles de Chk2 fosforilado en la treonina 68 aumentaban en las líneas celulares resistentes a BTZ NCI R20 y ARP1 KO R16 tras el tratamiento con BTZ+GSI durante 24h (Fig. 30 B, E). El tratamiento de las células NCI R20 con un inhibidor específico de Chk2, BML-277, revertía el incremento en la expresión de ULBP-2 inducido por la combinación BTZ+GSI (Fig.30C), y en las células ARP1 KO R16 la expresión de MICA (Fig. 30C).

La combinación BTZ+GSI en las células NCI R20 y ARP1 KO R16 aumentaba la expresión del inhibidor de ciclo celular p21, con un mayor incremento en las NCI R20. Sin embargo, el mismo tratamiento no modificaba los niveles de otros controladores de ciclo celular en la respuesta al daño en el ADN como p53 o p16 (Fig. 30D, E).

A continuación, estudiamos por citometría de flujo la actividad del BTZ, el GSI y la combinación de ambos sobre el ciclo celular. Tras 24h de tratamiento con BTZ, el porcentaje de células NCI R20 en la fase G2-M fue de un  $22,51 \pm 4,71\%$  vs  $14,3 \pm 3,29\%$  en la línea NCI R20 sin tratar,  $p=0,414$ , y en las células ARP1 KO R16 fue de un  $24,63 \pm 3,68\%$  vs  $16,1 \pm 0,55\%$  en las células sin tratar,  $p=0,101$ ). El GSI aumentaba el porcentaje de células en la fase G0-G1, en las células NCI R20 fue de un  $61,77 \pm 3,91\%$  vs  $48,99 \pm 0,50\%$  en las células sin tratar,  $p=0,0225$ ; y en las células ARP1 KO R16 fue de un  $75,66 \pm 0,67\%$  vs  $57,06 \pm 0,95\%$  en las células sin tratar,  $p<0,0001$ ). Por su parte, la combinación BTZ+GSI producía una marcada disminución de la fase S con respecto al control sin tratamiento ( $12,42 \pm 1,37\%$  vs  $31,36 \pm 3,58\%$  en la línea NCI R20,  $p=0,0005$ ;  $10,46 \pm 2,4\%$  vs  $23,73 \pm 0,97\%$ ,  $p=0,0033$ ; Fig. 30F).

Los resultados obtenidos tras el tratamiento combinado con BTZ+GSI en las células resistentes a BTZ sugieren que en las células se está produciendo una acumulación por dobles roturas, la señalización del daño en la que tiene relevancia la activación de Chk2 y la inducción de la parada de ciclo celular asociada a p21.





**Figura 30. Detección de daño, señalización y parada de ciclo por tratamiento con BTZ+GSI sobre líneas de MM resistentes a BTZ.**

A) Detección por western-blot de la fosforilación de H2A.X en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100µM); vinculina (vinc). B) Detección por western-blot de las quinasas Chk2 y Chk2 fosforilado (Thr68) en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100µM); vinculina (vinc). C) Análisis por citometría de flujo de la expresión de ULBP-2 en las células NCI R20 y de MICA en las células ARP1 KO R16 tratadas durante 24h con BTZ (20 nM y 16 nM, respectivamente) y GSI (100µM). Donde se indica, las células fueron incubadas con el inhibidor de Chk2 BML-277 (45µM) 24h antes del tratamiento con BTZ y GSI. A la derecha, detección por western-blot de las quinasas Chk2 y Chk2 fosforilado (Thr68) en la línea celular ARP1 KO R16 en presencia o ausencia de tratamiento con el inhibidor BML-277 y/o BTZ+GSI a las concentraciones previamente indicadas. D) Detección por western-blot de la expresión de los inhibidores de ciclo p21, p16 y p53 en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100µM); vinculina (vinc). E) Cuantificación de las proteínas analizadas por western-blot en (A), (B) y (D) implicadas en los mecanismos de daño en el ADN (n=3, media ± SEM). F) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio (PI) en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ

(20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M) (n=3, media  $\pm$  SEM). A la derecha, histogramas representativos del ciclo celular. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Para explorar si la activación de la DDR y la parada de ciclo asociada podían estar induciendo senescencia en las células de MM estudiamos una batería de marcadores relacionados con este estado celular. Las células senescentes presentan resistencia a apoptosis por lo que, en primer lugar, descartamos la inducción de apoptosis celular. Cultivamos las células con los distintos tratamientos y analizamos a las 24h y 72h la apoptosis celular por tinción con Anexina-V. Con ninguno de los tratamientos observamos una mayor acumulación de células Anexina-V<sup>+</sup> (Fig. 31A), por lo que corroboramos la resistencia a apoptosis en nuestras líneas celulares. Además, comprobamos por WB que no se aprecian alteraciones en las proteínas que controlan la apoptosis con los distintos tratamientos (Fig 31B). A continuación, analizamos la expresión del marcador de proliferación celular Ki67. En el caso de las células NCI R20, el porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> disminuyó de un 53,07  $\pm$  0,99% en el control sin tratamiento a un 28,19  $\pm$  4,10% al tratarlas con BTZ, y un 27,89  $\pm$  4,89% con la doble combinación BTZ+GSI. Mientras que en las células ARP1 KO R16 el porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> en las células sin tratamiento fue de 25,56  $\pm$  5,27% frente a 18,19  $\pm$  1,49% en las células con el tratamiento BTZ+GSI (Fig. 31C).

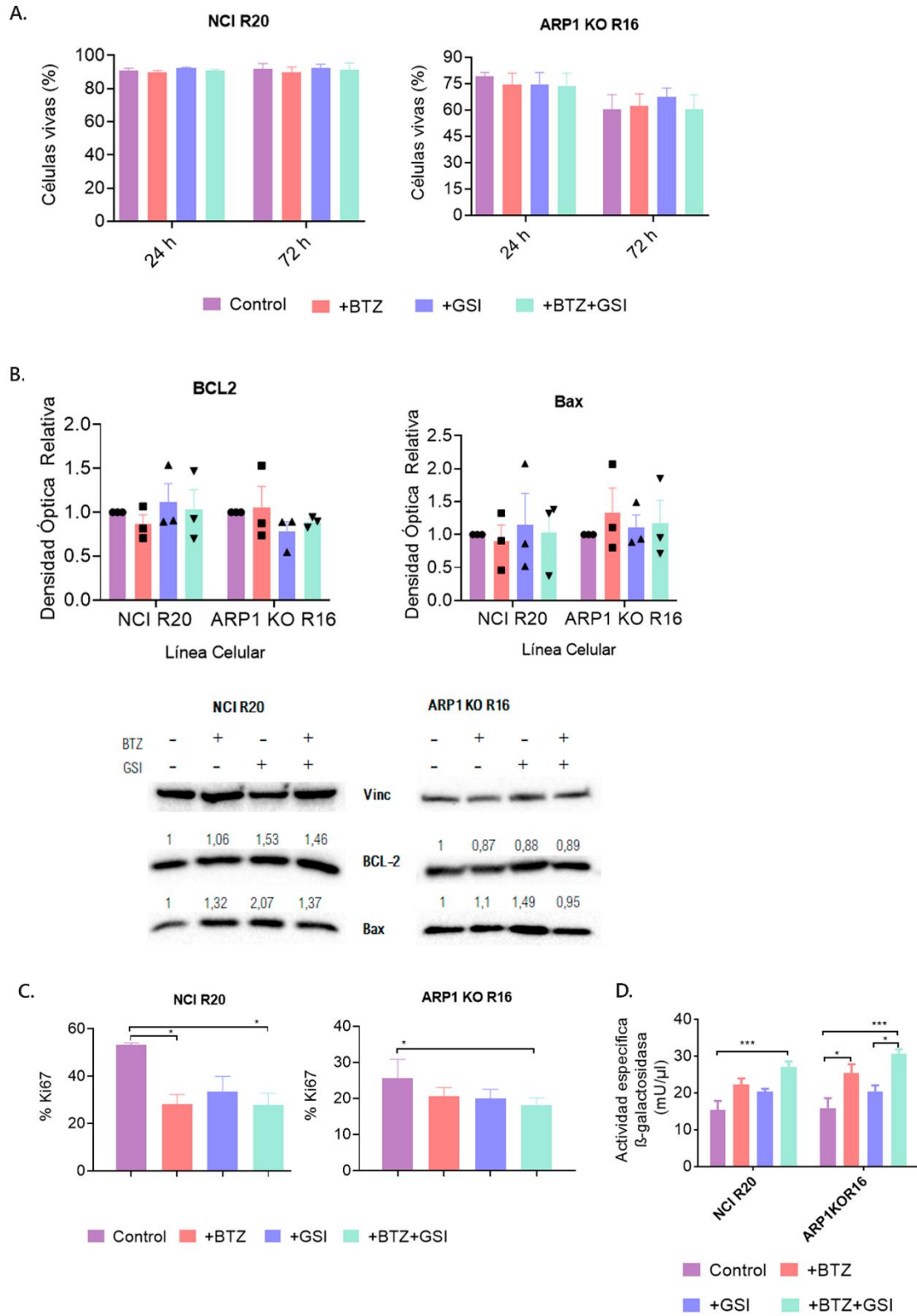
Posteriormente, llevamos a cabo un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa para estudiar si el tratamiento con BTZ+GSI confirmaba el estado senescente. En las células NCI R20 la actividad  $\beta$ -galactosidasa aumentó significativamente al tratar las células con BTZ+GSI durante 72h en comparación con las células en ausencia de tratamiento (12,56  $\pm$  3,1 mU/ $\mu$ l frente a 25,11  $\pm$  1,98 mU/ $\mu$ l, p=0,0009; Fig. 31D). Del mismo modo, en las células ARP1 KO R16, la actividad  $\beta$ -galactosidasa aumentó de manera significativa con el doble tratamiento BTZ+GSI durante 72h frente a las células sin tratamiento (30,61  $\pm$  1,22 mU/ $\mu$ l vs 15,88  $\pm$  2,65 mU/ $\mu$ l, p=0,0006; Fig. 31D).

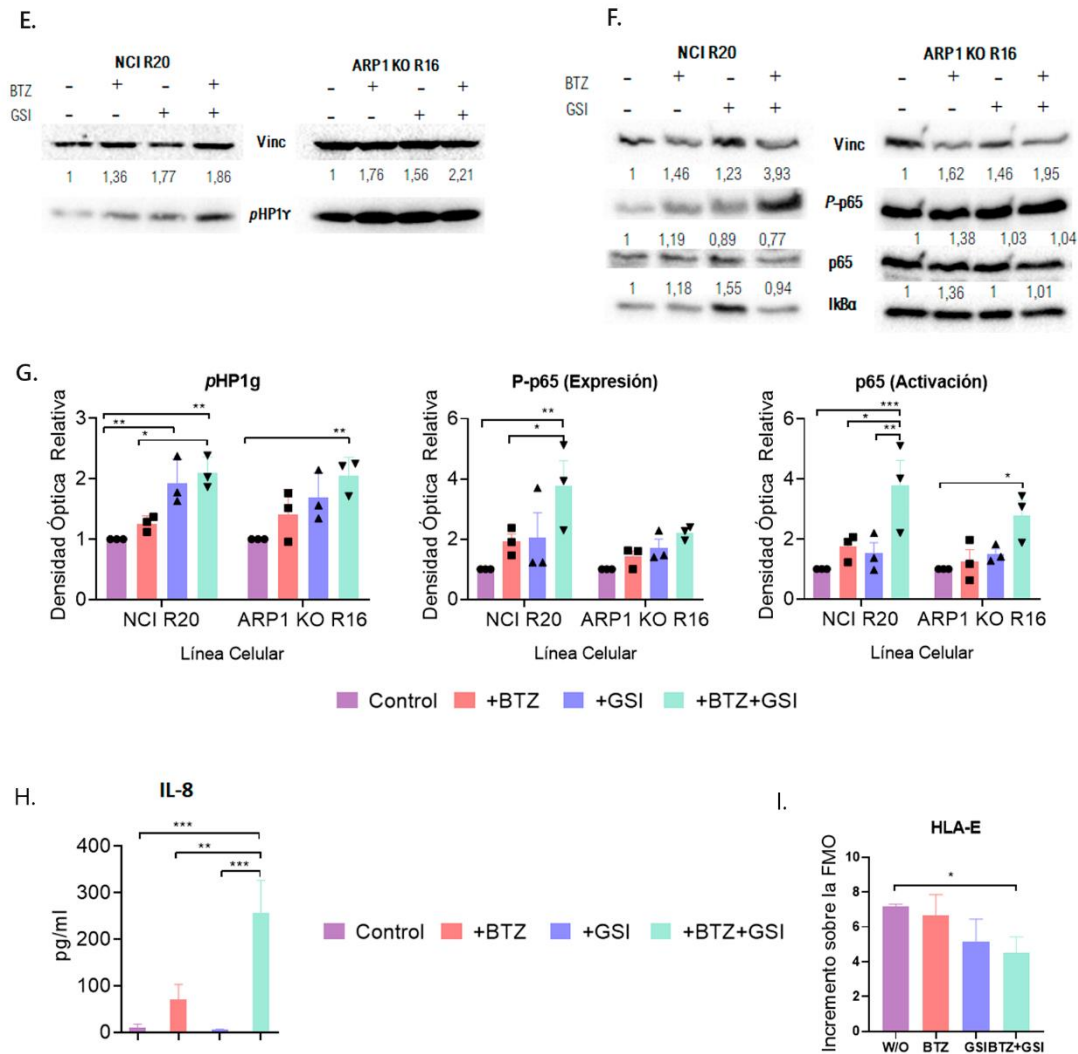
HP1 $\gamma$  es una molécula involucrada en la condensación de la heterocromatina, y su fosforilación (*p*-HP1 $\gamma$ ) en la Ser83 es un marcador de heterocromatinización en la célula en senescencia [437]. El tratamiento con BTZ+GSI durante 72h producía una activación de la fosforilación de HP1 $\gamma$  en las células resistentes NCI R20 y ARP1 KO R16 (Fig. 31E,G).

La activación de NF- $\kappa$ B es la ruta de señalización más importante para la inducción de senescencia [391]. Cuando estudiamos los niveles de expresión y activación de los componentes de esta ruta observamos un aumento de la fosforilación de la subunidad p65 con la combinación BTZ+GSI, con una mayor actividad en la línea NCI R20 (Fig. 31F,G). En el mismo sentido, observamos un incremento en la activación de la subunidad p65, que se calcula como el índice entre la expresión de p65 dividido entre la expresión de su forma fosforilada. El estudio de la acumulación de citoquinas a 72h en el sobrenadante de los cultivos de la línea ARP1 KO R16 reveló que la combinación BTZ+GSI aumentaba la concentración de IL-8 de forma sinérgica, concomitante a la activación de la ruta NF- $\kappa$ B (Fig. 31H). No se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de IL-6 (datos no mostrados). Como Pereira y colaboradores reportaron que las células tumorales senescentes son capaces de evadir su eliminación por células NK y CD8 T a través de la sobreexpresión de HLA-E [280], y la activación y expansión de células CB-NK aumenta la expresión de NKG2A [338], quisimos analizar la expresión de HLA-E con el tratamiento BTZ+GSI. Los resultados indican que el tratamiento con la combinación tras 72h disminuye significativamente los niveles de HLA-E (Fig. 31 I).

Los resultados sugieren que el tratamiento combinado con BTZ+GSI induce la entrada en senescencia de las células resistentes a BTZ, que se asocia a un aumento en la activación de la ruta NF- $\kappa$ B y a la liberación de citoquinas implicadas en el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).







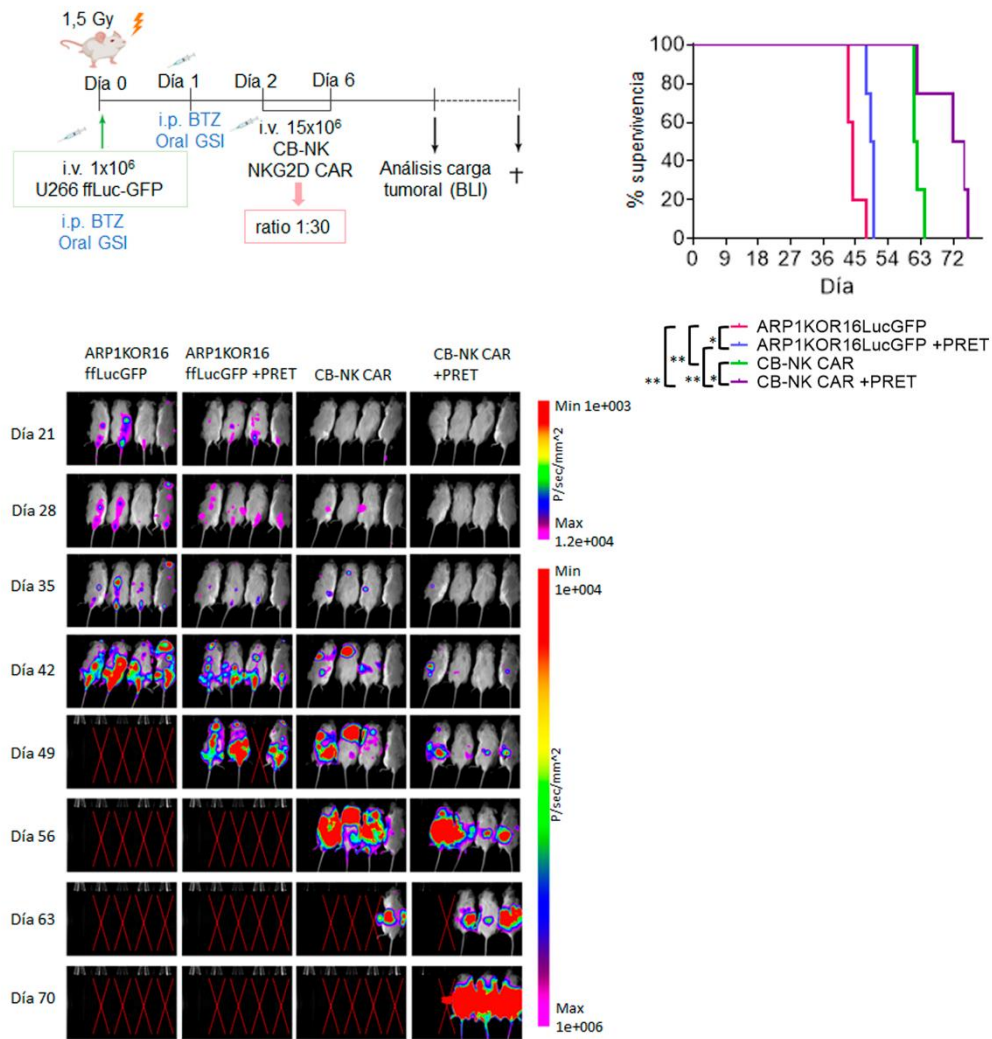
**Figura 31. Fenotipo senescente y activación de la ruta de NF- $\kappa$ B en células de MM resistentes a BTZ tratadas con BTZ+GSI.**

A) Análisis de la apoptosis celular en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M) por citometría de flujo utilizando Anexina-V (n=3, media  $\pm$  SEM). B) Análisis por western-blot de la expresión de las proteínas apoptóticas BCL-2 y Bax en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M) (n=3, media  $\pm$  SEM). C) Análisis por citometría de flujo de la expresión de Ki67 en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M) (n=3, media  $\pm$  SEM). D) Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa mediante un ensayo de fluorimetría en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 72h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M) (n=3). E) Detección por western-blot de la fosforilación de HP1 $\gamma$  en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 72h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M); vinculina (vinc). F) Detección por western-blot de la activación de la ruta NF- $\kappa$ B analizada por la fosforilación de la subunidad p65 en las líneas celulares NCI R20 y ARP1 KO R16 tras 24h de tratamiento con BTZ (20 o 16nM, respectivamente) y/o GSI (100 $\mu$ M); vinculina (vinc). G) Cuantificación de las proteínas implicadas en los mecanismos de senescencia analizadas por western-blot en (E) y (F) (n=3, media  $\pm$  SEM). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. La activación de p65 se calcula como la proporción entre la expresión de p65 y la expresión de p65 en su forma fosforilada (n=3, media  $\pm$  SEM). H) Cuantificación mediante citometría de flujo con el panel humano personalizado LEGENDplex™ de la concentración de IL-8 producida por las células ARP1 KO R16 tras el tratamiento con BTZ (16nM) y/o GSI (100 $\mu$ M) durante 72h (n=3, media  $\pm$  SEM). I) Análisis por citometría de flujo de la expresión de HLA-E en células ARP1 KO R16 tras 72h de tratamiento con BTZ (16nM) y/o GSI (100 $\mu$ M) (n=3, media  $\pm$  SEM). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### 6.3. El pretratamiento con la combinación BTZ+GSI de las células de MM resistentes aumenta la eficacia in vivo de las células CB-NK NKG2D CAR

Para corroborar la potenciación de la actividad antitumoral de las células CB-NK NKG2D CAR con la combinación BTZ+GSI observada en los estudios in vitro (Fig. 29G), realizamos un modelo in vivo con la línea celular de MM resistente a BTZ y en la que la expresión de BCMA había sido suprimida y modificada genéticamente para que expresara ffLucGFP (ARP1 KO R16 ffLucGFP) (Fig. 32). El esquema de tratamiento utilizado fue el siguiente: se le administraron  $1 \times 10^6$  células ARP1 KO R16 ffLucGFP a los ratones inmunodeficientes NSG; la mitad de los ratones se trataron con BTZ 0,2 mg/ratón (i.p.) y GSI 0,24 mg/ratón (oral) el día de infusión del tumor, así como al día siguiente. Los días 2 y 6 posteriores a la infusión del MM, se administraron  $15 \times 10^6$  células CB-NK NKG2D CAR a los grupos de ratones correspondientes. Mientras que el pretratamiento con BTZ+GSI apenas retrasó unos días la supervivencia de los ratones con respecto al grupo en ausencia de tratamiento (49,5 vs 44 días,  $p=0,0113$ ), la combinación del doble tratamiento BTZ+GSI junto con la terapia CB-NK NKG2D CAR consiguió aumentar la supervivencia media de los ratones 24 días (73,5 vs 44 días,  $p=0,0046$ ), 12 días más que empleando solo la terapia CB-NK NKG2D CAR (73,5 vs 61,5 días,  $p=0,0346$ ).

Para descartar una selección sesgada de determinados pacientes y que el efecto antitumoral se debiera a la compatibilidad KIR-HLA entre las líneas celulares de MM y las células CB-NK, se estudió la interacción de inhibición KIR-HLA. Los resultados mostraron que las células CB-NK de los dos donantes utilizados para este experimento se encontraban muy inhibidas por este reconocimiento, con la presencia de tres interacciones de inhibición KIR-HLA (*match*) (Tabla 10).



**Figura 32. Potenciación in vivo de la actividad citotóxica de las células CB-NK NKG2D CAR mediante el pretratamiento de las células de MM con BTZ+GSI.**

Diseño experimental del modelo murino NSG ortotópico diseminado de MM generado mediante la infusión i.v. de  $1 \times 10^6$  células ARP1 KO R16 ffLucGFP seguida por 2 infusiones i.v. de  $1,5 \times 10^7$  células CB-NK NKG2D CAR a días 2 y 6. Actividad citotóxica in vivo de las células CB-NK NKG2D CAR frente a las células ARP1KOR16ffLucGFP en los ratones NSG. La mitad de los ratones fueron acondicionados con BTZ 0,2 mg/ratón (i.p.) y GSI 0,24 mg/ratón (oral) el día de infusión del tumor y al día siguiente. Curva de supervivencia Kaplan-Meier (n=4). Imágenes de la carga tumoral monitorizada por biolumiscencia (BLI) a los tiempos indicados en los ratones infundidos con las células ARP1 KO R16 ffLucGFP sin tratamiento o acondicionados con BTZ y GSI y tratados con CB-NK NKG2D CAR. La significación entre los distintos grupos se muestra en el panel derecho. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

HLA donante 1	2DL1 (ligando: HLA-C2)	2DL2/2DL3 (ligando: HLA-C1)	3DL1 (ligando: HLA-Bw4)
<b>C2</b>	match		
<b>C1/C2</b>		match	
<b>Bw4</b>			match

HLA donante 2	2DL1 (ligando: HLA-C2)	2DL2/2DL3 (ligando: HLA-C1)	3DL1 (ligando: HLA-Bw4)
<b>C2</b>	match		
<b>C1/C2</b>		match	
<b>Bw4</b>			match

**Tabla 10.** Estudio de la compatibilidad HLA-KIR entre la línea celular de MM ARP1 KO R16 y las células CB-NK de los donantes utilizados en el experimento in vivo anterior.

## 6. DISCUSIÓN



A pesar de los avances durante la última década en el tratamiento de los pacientes con MM, la enfermedad hoy en día continúa siendo incurable, con una supervivencia global de 5,6 meses en pacientes penta-refractarios. En MM las células del sistema inmune están inmunosuprimidas, sobre todo en etapas avanzadas de la enfermedad. En este contexto de recaída y refractariedad surge la necesidad de terapias alternativas o secuenciales a las combinaciones de tratamientos previos y basadas en mecanismos distintos de acción. El objetivo principal de esta tesis es generar una inmunoterapia eficaz para el tratamiento de pacientes de MM/RR. En concreto, postulamos que una plataforma de células NK CAR alogénicas podría superar ese contexto de inmunosupresión [338] y poseer ventajas en cuanto a la seguridad, rapidez en la obtención y coste en comparación con la inmunoterapia T CAR. Por otro lado, basándonos en resultados preclínicos previos con células NK CAR NKG2D autólogas generadas en nuestro laboratorio [341] y los resultados obtenidos con la terapia T CAR BCMA [147, 246], hemos seleccionado estos dos CAR como relevantes en MM/RR para comparar, por primera vez, la eficacia y hematotoxicidad de cuatro nuevos productos alogénicos inmunoterapéuticos CAR NKG2D y BCMA procedentes de la línea celular NK-92 y de células NK de sangre de cordón umbilical.

Datos preliminares procedentes de un ensayo clínico en fase I con células T-CAR NKG2D ha demostrado falta de eficacia, debido a la persistencia limitada de esta inmunoterapia en los pacientes, y asociada a la baja expresión de los ligandos diana en las células de MM/RR. Este escenario justifica la búsqueda de terapias para aumentar la inmunogenicidad de las células de MM/RR en combinación con las células NK CAR NKG2D alogénicas.

## 1. LAS CÉLULAS NK-92 REDIRIGIDAS CON LOS CAR DE BCMA Y NKG2D MUESTRAN UNA POTENCIA LÍTICA SIMILAR FRENTE A LÍNEAS CELULARES DE MM Y SU EFICACIA SE ASOCIA A LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE SUS DIANAS CAR.

Las líneas celulares NK son una fuente inagotable y universal de células NK para obtener gran cantidad de efectores alogénicos homogéneos a bajo coste, libres de la posibilidad de contaminaciones por células T que podrían generar EICH, como es el caso de las células NK primarias alogénicas, o inhibidas por factores supresores relacionados con la



enfermedad o los tratamientos quimioterápicos previos, como las células NK primarias autólogas. Las células de la línea celular NK-92 han sido las más comúnmente utilizadas desde que estuvieron disponibles en 1998, porque muestran una citotoxicidad alta y estable *in vitro* sobre gran diversidad de tumores y su manipulación genética es sencilla [443]. Por esta razón, incluimos los efectores NK-92 como una de las fuentes para generar NK CAR. En nuestro trabajo, hemos demostrado que se pueden generar células NK-92MI transducidas con los CAR de NKG2D o BCMA, que son dos nuevos efectores estables, que tienen mayor actividad citotóxica que las células parentales NK-92MI frente a las líneas de MM, de manera similar a lo que describen otros grupos [320, 337, 444]. En la comparación directa entre las células NK-92MI con los CAR de BCMA y NKG2D, cuando se controla el número de copias integradas del LV, ambos efectores exhiben una actividad citotóxica anti-MM muy similar sobre las líneas seleccionadas (Fig. 21B). De manera reseñable, el porcentaje de lisis específica de cada uno de los efectores NK-92MI CAR se asocia a los niveles de expresión de sus respectivas dianas. La comparación indirecta con distintos trabajos donde se emplean las células NK-92 con otras especificidades CAR sobre las mismas líneas revela resultados superiores en cuanto a su eficacia. Por ejemplo, Chu y col. han generado previamente células NK-92 transducidas con un CAR anti-CS1 que contiene el dominio coestimulador de CD28. Los autores reportan una lisis específica sobre células U266 a ratio 5:1 (D:E) del 20% con la terapia NK-92 CS-1 CAR [320]. En nuestro trabajo mostramos una lisis sobre las células U266 a ratio 1:1 (D:E) cercano al 80% empleando la terapia NK-92MI NKG2D CAR o NK-92MI BCMA CAR. En otro trabajo, en el que se utilizaron células NK-92MI anti-CD138 CAR frente a MM, obtienen una potencia anti-tumoral *in vitro* de un 55%, a un ratio 1:1 (D:E) frente a la mismo modelo de células de la línea U266 [319]. Aunque estas moléculas CAR difieren en la cantidad y en el tipo de coestimuladores y, por tanto, resulta compleja su comparación, los resultados sugieren que nuestros efectores NK-92 CAR exhiben una capacidad de lisis superior, a ratios más bajos que otros productos NK-92 publicados previamente, sobre líneas celulares de MM.

En cuanto a la eficacia de los efectores NK-92 frente a células mielomatosas primarias de pacientes *in vitro*, en el trabajo de Chu y col. consiguen una lisis específica de las células plasmáticas patológicas de en torno al 40% en promedio, a un ratio 1:40 (D:E). En nuestro trabajo, se han obtenido eficacias con los tratamientos NK-92MI NKG2D CAR y BCMA CAR muy similares, donde exhiben una lisis tumoral del 20% y 45%, respectivamente, a

ratio 1:32 (D:E). Estos resultados indican que la actividad lítica in vivo sobre las células primarias de MM es inferior a la mostrada frente a las distintas líneas de MM. Aunque se ha analizado la actividad lítica in vitro de los efectores NK-92 MI CAR sobre un número muy reducido de pacientes (n=6) (Tabla 7), no existe una correlación entre los niveles de expresión y la lisis específica lograda para cada paciente (datos no mostrados), tal y como se ha reportado para la diana BCMA, que se sobreexpresa en el 100% de las células plasmáticas patológicas de los pacientes comparado con las células no tumorales, pero a unos niveles muy variables [241, 445].

Para evitar el escape que ejerce la presión selectiva de las terapias T CAR sobre el tumor, provocada por la disminución de la expresión o desaparición de los antígenos diana, que puede inducir las recaídas, se han diseñado estrategias de reconocimiento múltiple a través de la generación de CAR duales, que rescatan la sensibilidad del tumor al CAR al menos a una de las dianas [257-259]. Paralelamente, siguiendo la misma estrategia y con el fin de mejorar la eficacia de la terapia NK-CAR en diversos tipos tumorales, se están diseñando nuevas moléculas CAR duales con reconocimiento múltiple de antígenos tumorales, que se construyen combinando distintos dominios coestimuladores. En nuestro trabajo, la combinación de la expresión de ambos CAR no produce una sinergia en cuanto a la actividad lítica de las células con los CAR duales frente a las que expresan los CAR simples, pero sí amplía la cobertura citotóxica sobre las líneas celulares de MM, en concordancia con lo publicado por Roex y col. con células NK-92 que expresan el CAR dual CD19-BCMA CAR [343]. Otros grupos sí han reportado una mejora en la citotoxicidad frente a una línea celular de LLA, cuando se utiliza el CAR dual CD19-CD138 expresado en las células NK-92, en comparación con los CAR simples anti-CD19 y anti-CD138 [446]. En relación con el diseño con distintos coestimuladores en la construcción CAR dual, Xu y colaboradores describen que las células NK-92 que expresan el CAR anti-CD5 con el dominio coestimulador 2B4 presentan una mayor actividad antitumoral que los mismos efectores que contienen un CAR cuyo dominio coestimulador es 4-1BB [447]. A pesar de que las señales coestimuladoras 4-1BB y CD28 activen rutas de señalización diferentes, NF- $\kappa$ B y PI3K/AKT, respectivamente, la coexpresión de NKG2D CAR y BCMA CAR con distintos coestimuladores en las células NK-92 CAR produce una actividad lítica que no supera a las de las NK-92MI que expresan los CAR por separado, por lo que descartamos esta estrategia para los posteriores estudios. Aunque no se ha abordado este efecto en nuestro estudio, postulamos

que la línea celular NK-92 CAR presenta un umbral límite de activación y el potencial lítico de las células probablemente no se pueda optimizar añadiendo más señales coestimuladoras.

MICA es el ligando principal del receptor activador NKG2D. Los pacientes de MM/RR presentan niveles elevados de MICA soluble (sMICA) en el suero, lo que previamente se ha asociado a un peor pronóstico [200]. MICA en su forma soluble impide la función efectora de las células NK y T por disminución de la expresión del receptor NKG2D en membrana [448, 449]. Hemos demostrado que la capacidad lítica de las células NK-92 NKG2D CAR no se ve alterada por los niveles promedio de sMICA cuantificados en los pacientes de MM/RR (0,5-5ng/ml) [200] ni cuando tratamos los cocultivos con niveles suprafisiológicos de sMICA. Estos resultados corroboran lo observado por otro grupo en células T que expresan el NKG2D CAR [202]. BCMA soluble (sBCMA) también se encuentra en alta concentración en el suero de los pacientes de MM/RR y se ha reportado como factor pronóstico [175, 450]. En un ensayo clínico con terapia T-CAR BCMA se observó una correlación entre la tasa de respuesta y reducidos niveles basales de sBCMA. Los pacientes que no respondieron o que progresaron de forma temprana, presentaban niveles de sBCMA más elevados (300 ng/ml), por lo que concluyeron que altos niveles de sBCMA antes de la terapia, interfieren en la eficacia de la terapia CAR anti-BCMA [451]. En nuestro trabajo, hemos demostrado que la concentración promedio en los pacientes de MM/RR de sBCMA (500 ng/ml) [438], disminuye significativamente la actividad anti-tumoral de las células NK-92MI BCMA CAR frente a una línea celular de MM (Fig. 20G).

## 2. LA IRRADIACIÓN DE LAS CÉLULAS NK-92MI ANULA SU EFICACIA IN VIVO

Hasta la fecha, las únicas células autorizadas por la FDA para uso clínico son las células NK-92 dependientes de IL-2 que deben obligatoriamente ser infundidas previo acondicionamiento por gamma-irradiación a 10Gy, para evitar su injerto en el paciente y la posibilidad de desarrollar un tumor de células NK [306]. Las células NK-92MI son una variante de la línea celular NK-92, modificadas genéticamente para expresar IL-2, por lo que su crecimiento se vuelve independiente de esta citoquina [316]. La elección inicial de esta variante en el estudio se debe a que el aporte de IL-2 sistémico por vía

intravenosa puede producir efectos adversos graves en los pacientes, entre otros, síndrome de lisis capilar. Por tanto, las células NK-92MI podrían facilitar su autosostenimiento y evitar toxicidades, elevando las concentraciones de IL-2 solo en el sitio del tumor, cuando se administren in vivo. Cabe destacar que la línea NK-92MI es más sensible a la gamma-irradiación que la línea celular NK-92 original [316]. Existe suficiente consenso acerca de que las células NK-92 y NK-92MI acondicionadas con gamma-irradiación a 10 Gy conservan su potencial lítico intacto in vitro mientras su proliferación se detiene y se produce la pérdida de viabilidad total de estos efectores en un plazo máximo de una semana [316, 343, 443]. Nuestros resultados corroboran una potencia lítica similar in vitro que las células sin irradiar y sitúan la pérdida de viabilidad en un plazo de 72 horas (Fig. 23A y 23G). Existe controversia sobre si la irradiación puede limitar o incluso erradicar la actividad in vivo de estos efectores porque disminuye directamente su persistencia. Los distintos resultados obtenidos en los modelos preclínicos en ratón hasta la fecha son el reflejo de una falta de homogenización en las condiciones de los ensayos. El tipo de línea (NK-92 o NK-92MI), la dosis de efectores y los regímenes de infusión (número de dosis y espaciamiento), la combinación con citoquinas de sostenimiento u otras terapias (p. e. IL-2, mAb), las dosis de irradiación y el tiempo de latencia de la enfermedad, que van a condicionar los resultados de la preclínica anti-tumoral con estas líneas celulares. En el ratón, mientras que algunos autores han descrito que la irradiación de las células NK-92 impacta significativamente sobre su viabilidad y funcionalidad citotóxica [452], otros grupos han demostrado potencia lítica y eficacia in vivo de estas células cuando se infunden irradiadas [453, 454]. Distintos trabajos en diferentes modelos de tumor demuestran la erradicación de la enfermedad in vivo administrando células NK-92 en monoterapia sin irradiar [455, 456]. Otros modelos reportan eficacia in vivo únicamente cuando combinan los efectores NK-92 con anticuerpos monoclonales [308, 457] o cuando se usan en combinación con rhIL-2 por vía intravenosa [458, 459]. En este trabajo, hemos mostrado la falta completa de eficacia de las células NK-92 y NK-92MI en monoterapia in vivo siempre que hayan sido sometidas al acondicionamiento por irradiación de su indicación clínica, independientemente de la dosis (hasta  $64 \times 10^6$  células totales) o el esquema de tratamiento (3 dosis espaciadas 48 horas y hasta una semana). Nuestros resultados indican que la infusión de células NK-92MI sin irradiar posee actividad anti-MM pero invaden la MO (Fig. 24B) y matan a los ratones de manera prematura desarrollando un tumor de células NK (Fig. 24A), probablemente porque son capaces de proliferar dentro del animal sin

necesidad de un aporte exógeno de IL-2. Este resultado es coherente con el obtenido en el trabajo de Liu y col. donde describen que las células NK-92MI CAR-CD19 en ausencia de irradiación son capaces de persistir y proliferar en ratones NOD-SCID [442]. Otros trabajos que utilizan células NK-92 sin irradiar no han reportado mortalidad de los ratones por el tratamiento con estas células [320, 460], probablemente debido a que las células NK-92 exhiben dependencia crítica de la IL-2 humana [306]. Es importante resaltar que en la mayoría de estos trabajos donde se infunden células NK-92MI sin irradiar la latencia de la enfermedad tumoral es inferior al tiempo hasta la muerte inducida por la proliferación de los efectores, normalmente menor a tres semanas, lo que puede enmascarar el desarrollo del linfoma NK-92 en los animales. Este no es el caso del modelo de MM U266ffLucGFP desarrollado en este trabajo, cuya latencia en los ratones sin tratamiento es muy larga, aproximadamente entre 8-9 semanas (Fig. 23B).

En la clínica, tradicionalmente se ha publicado que la irradiación de las células efectoras limita enormemente su persistencia y, por ello, repercute en la falta de eficacia [325, 326, 328]. Algunos trabajos también han relacionado la falta de persistencia de los efectores NK-92 con el rechazo por parte de las células inmunes del huésped [443, 452, 461]. En este escenario, en la mayoría de los ensayos clínicos en los que se infunden altas dosis repetidas de células NK-92 en combinación con IL-2, no se han observado eventos adversos graves, pero las respuestas han sido en todo caso modestas [325, 327] o directamente inexistentes [328]. En el contexto NK-CAR, el primer ensayo clínico fase I con células CD33 CAR arrojó resultados muy similares, un perfil de seguridad excelente pero el tratamiento no consiguió inducir respuestas objetivas [329]. Es tentador elucidar con la posibilidad de que las respuestas anecdóticas detectadas con estos efectores en los pacientes se deban a la reactivación inmune en el paciente, causada por la infusión de la IL-2 y que las células NK-92, en realidad, carezcan de actividad clínica. En relación a la persistencia en nuestro modelo in vivo, hemos detectado células NK-92MI irradiadas a las 3 horas de la infusión en la totalidad de los animales, pero estos efectores persisten menos de 48 horas en el modelo de ratón U266 inmunodeficiente (Fig. 23D). Por tanto, existe una discordancia entre la actividad citolítica in vitro con las células irradiadas a 3 horas con respecto a la lisis tumoral que inducen las NK-92MI durante el mismo periodo de tiempo. Este resultado sugiere que las células NK-92MI se desactivan durante las 3 horas tras la infusión por otros mecanismos que no han sido abordados en este trabajo y que no dependen de su viabilidad en el animal, ni del posible rechazo por efectores

inmunes endógenos. En este sentido, la persistencia de las células NK-92 en los pacientes infundidos también es objeto de controversia. En un ensayo clínico en el que infundieron células NK-92 irradiadas, pudieron detectarse en dos pacientes células NK-92 CAR a los días 3, 5 y 8 post-infusión [329]. Tonn y col. no pudieron detectar células NK-92 en los pacientes después de 24-48h de la infusión de las células [325]. Más en la línea con nuestros resultados, Williams y col. en un ensayo con NK-92 en MM no detectaron efectores más allá de 15 minutos tras su administración [327]. Una vez confirmada la falta de eficacia de los efectores NK-92 y NK-92MI irradiadas intentamos dos estrategias diferentes para rescatar las células NK-92MI como posible inmunoterapia anti-MM. Las aproximaciones se centran en la reducción de las dosis de irradiación y en la modificación genética de las células con un interruptor suicida. Tam y colaboradores reportaron que la proliferación de las células NK-92MI se podía controlar con dosis bajas de irradiación, para aumentar el periodo de tiempo que pueden actuar las células efectoras frente a las dianas tumorales antes de su desaparición [316]. Sin embargo, hemos demostrado que dosis más bajas, de 2,5 y 3,75 Gy, no son suficientes para cesar la proliferación de las células NK-92MI in vivo y los ratones terminan sucumbiendo (Fig. 24A). Liu y col. estudiaron la actividad anti-tumoral de células NK-92MI CD19-CAR frente a tumores CD19<sup>+</sup> irradiando a dosis intermedias de 5Gy, y demostraron que conseguían controlar su proliferación manteniendo la eficacia de los efectores [442]. A esta dosis (5Gy), no observamos eficacia de los efectores NK-92 CAR en nuestro modelo in vivo frente a MM (Fig. 24C).

A pesar de que las células NK-CAR en general han demostrado ser seguras, algunos grupos han incorporado interruptores suicidas mediante la expresión ectópica de caspasa 9 inducible (iCasp9) y han probado su efectividad in vitro [462] e in vivo [338]. En este trabajo, hemos generado células NK-92 CAR que expresan de forma ectópica el interruptor suicida iCasp9- $\Delta$ CD19. Estas células son eliminadas in vitro tras la administración del inductor AP1903 o rimiducid, desencadenando la apoptosis de las células, con las que se obtienen viabilidades inferiores al 3% (Fig. 25F). Oelsner y colaboradores utilizaron la misma aproximación in vitro con éxito en células NK-92 FLT3-CAR que expresan la terapia suicida iCasp9 [462]. Sin embargo, en nuestro trabajo observamos que la administración del inductor AP1903 (rimiducid) no consigue eliminar las células efectoras sin irradiar en nuestro modelo in vivo, que pretende la acumulación inicial de efectores para garantizar la eficacia. Esta falta de control se produce

probablemente por la acumulación residual de células NK-92MI CAR tras tres infusiones repetidas, que es suficiente para que las células escapen a la acción pro-apoptótica del inductor. Por tanto y de momento, esta estrategia en células NK-92MI CAR sin irradiar no parece segura para su utilización en humanos. Para futuros ensayos, recomendamos intercalar la administración del inductor en los animales entre las dosis de células NK-92MI CAR.

### 3. LAS CÉLULAS CB-NK BCMA CAR SON MÁS EFICACES ELIMINANDO CÉLULAS PRIMARIAS DE MM IN VITRO E INDUCEN RESPUESTAS MÁS DURADERAS IN VIVO QUE LAS CÉLULAS NK NKG2D CAR

La modificación genética constituye una de las principales limitaciones en la terapia NK-CAR para conseguir una expresión estable de la molécula quimérica, principalmente en células NK maduras derivadas de SP [463]. Las CB-NK son más permisivas a la transducción con vectores virales, debido a su mayor tasa proliferativa, como se ha demostrado en un ensayo clínico con células CB-NK CAR [338]. Los vectores lentivirales (LV) pueden ser pseudotipados con distintas proteínas de la envuelta para modificar el tropismo dirigido hacia la célula de interés. Para la transducción de las células T se han utilizado de forma masiva LV pseudotipados con la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). La envuelta VSV-G posee algunas ventajas, como un amplísimo tropismo porque reconoce al receptor de LDL (LDL-R), y confiere resistencia a los ciclos de congelación-descongelación y ultra-centrifugación a la partícula lentiviral, lo que permite obtener altas concentraciones del LV [464]. Sin embargo, otros estudios han reportado que VSV-G no es eficaz para la infección de células NK porque expresan niveles muy bajos de LDL-R. En consecuencia, se requieren títulos virales altos que pueden ser tóxicos para la célula. Alternativamente, se han seleccionado proteínas de virus linfotrópicos como la envuelta Baboon (BaEV) o del virus del sarampión para las transducciones de células NK, porque reconocen receptores de alta expresión en células NK, como ASCT1 y ASCT2 [465]. En relación con la modificación genética, en este trabajo hemos establecido un método de producción de células primarias CB-NK CAR con el que hemos obtenido una elevada eficacia de transducción con LV VSV-G, rindiendo transducciones que en promedio superan el 50% de eficacia a multiplicidades

de infección (MOI) bajas (Fig. 26B). Los niveles de transducción están en consonancia con lo publicado por Boissel y colaboradores [337], que obtuvieron un amplio rango de transducción con LV VSV-G, desde el 19% hasta el 73%, en células CB-NK CD19 CAR. Aunque no pueden compararse directamente, partículas LV VSV-G con la misma construcción CAR NKG2D y una MOI similar, transdujeron de forma estable, en promedio, el 20% de las células NK autólogas de pacientes con MM, lo que sugiere de nuevo una mayor permisividad a la transducción por estos LV de las CB-NK [341]. Como citamos anteriormente, un único estudio preclínico ha abordado el tratamiento en MM con células CB-NK BCMA CAR. Bachiller y col. publicaron una mayor eficacia de transducción en células CB-NK utilizando la BaEV en comparación con la VSV-G [345]. No obstante, las partículas LV con BaEV sólo transdujeron las células CB-NK un 20% [345]. Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que BaEV es una envuelta que genera partículas LV lábiles, cuyas producciones rinden títulos cien veces inferiores a los LV VSV-G, probablemente la causa por la que está limitando su escalado clínico. Más aún, los LV construidos con esta envuelta producen inquietud regulatoria y no están aprobados aún por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

En relación con su potencial citotóxico *in vitro*, otros grupos han reportado que las células NK de cordón exhiben un fenotipo más inmaduro, donde existe una mayor expresión de receptores inhibitorios como KIRs o NKG2A, producen menos niveles de perforina y granzima y presentan una menor capacidad citotóxica comparado con las células NK de sangre periférica [332, 466]. Aunque de nuevo la comparación no es paralela, células NK NKG2D CAR procedentes de SP de pacientes con MM destruyen aproximadamente el 70% de las células diana U266 a ratio 1:4 (D:E) [341], mientras que en los resultados de este estudio las CB-NK NKG2D CAR consiguen la misma eficacia a ratio mucho menor, 2:1 (D:E) (Fig. 27A). Estos resultados, teniendo en cuenta distintos porcentajes de transducción y las diferencias en el origen de la célula NK, sugieren una mayor eficacia *in vitro* de las células CB-NK CAR. Por primera vez, en este trabajo se comparan frente a frente la potencia citolítica de células CB-NK CAR con células NK-92 CAR *in vitro* en el que se introduce el control de copias de los LV CAR. Hemos observado que las células CB-NK CAR producen niveles más bajos de granzima y perforina en comparación con las células NK-92 CAR (Fig. 27B). Sin embargo, la capacidad citotóxica *in vitro* entre estas poblaciones es muy similar. *In vivo*, sólo las células CB-NK CAR exhiben eficacia



anti-MM debido probablemente a la mínima persistencia de las células NK-92 CAR, cuando se las acondiciona para su uso clínico, como se ha citado anteriormente. El resultado más importante en este bloque es la comparación entre las células CB-NK NKG2D CAR frente a las células CB-NK BCMA CAR in vivo en condiciones de expresión similar del CAR, controlado por copias integradas del provirus (VCN). Tal y como podemos observar, ambas poblaciones producen respuestas en los animales del modelo U266, pero son mucho más prolongadas en el caso de los efectores CB-NK BCMA CAR (Fig. 28D). Baumeister y col reportaron falta de eficacia en el ensayo clínico Fase I en el que se trataron pacientes de MM/RR con (NCT03018405) células T NKG2D CAR. Este ensayo se llevó a cabo modificando las células T con moléculas CAR de primera generación y en ausencia de acondicionamiento linfodeplectivo. Estas variables pudieron haber condicionado su falta de eficacia por falta de coestímulo en las células y rechazo del sistema inmune del paciente. Sin embargo, nuestros resultados con un CAR de segunda generación y en ratones inmunodeficientes descartan estas hipótesis. Baumeister y col. observaron la falta de persistencia de la población efectora NKG2D CAR T en los pacientes y recomendaron aumentar la densidad de la diana CAR en las células tumorales para aumentar la eficacia de la inmunoterapia [253]. Nuestros resultados sugieren una situación similar en la que existe una limitación de la potencia lítica de los efectores NK NKG2D CAR, aun en un escenario en el que se infunden dos dosis de tratamiento.

Por otra parte, Bachiller y col. sostienen que las células CB-NK CAR solo tienen eficacia a dosis altas (ratios D:E elevados) y que es la población CB-NK, y no la CB-NK CAR, la que puede incrementar en combinación la eficacia antitumoral de las células T-CAR frente a MM [345]. Los mismos autores aducen que la actividad CB-NK CAR se reduce rápido en el tiempo en los animales y precisa de la presencia de IL-2 producida por las células T, lo que desaconseja su uso clínico. A diferencia de lo observado, nuestro trabajo indica eficacia sostenida en el tiempo (al menos hasta 150 días) de las células CB-NK BCMA CAR en ausencia de células T-CAR sin necesidad de un aporte exógeno de IL-2. La diferencia de eficacia entre las CB-NK BCMA CAR en el trabajo de Bachiller y col. y el presente, puede deberse al modelo de línea celular empleado en el ratón, puesto que las células ARP1 son intrínsecamente resistentes a las células NK y sensibles a las células T (NKG2D-L bajos, HLA-I elevados). En relación con la limitación de uso de las CB-NK CAR en altas dosis, ensayos clínicos con células NK alogénicas en multidosis

(NCT05020678) o empleando dosis de hasta  $10^{10}$  células/m<sup>2</sup> totales han mostrado un excelente perfil de seguridad en los pacientes en los que no se alcanza la máxima dosis tolerada [325]. En 2021, Ng y col. publicaron la coexpresión de BCMA CAR junto con CXCR4 en células NK de SP mediante electroporación de mARN, para aumentar la infiltración en la MO y potenciar su eficacia. En nuestro modelo in vivo hemos demostrado que no es necesario redirigir las células mediante expresión de CXCR4 para que los efectores eliminen las células de MM en la MO. Esto podría deberse a que durante el proceso de producción de las CB-NK CAR, la disminución en la expresión de CXCR4 es menos acusada que en las células NK de SP [332]. Sin embargo, trabajos previos del grupo indican que células SP-NK NKG2D CAR autólogas de pacientes de MM pueden erradicar por completo la enfermedad en el 25% de los ratones tratados sin necesidad de favorecer su infiltración a la MO [341]. Aunque no se han comparado directamente en este trabajo células SP-NK frente a células CB-NK in vivo, en el referido estudio previo en nuestro laboratorio con células SP-NK CAR, se alcanzaron respuestas profundas con situaciones de enfermedad mínima residual negativa [341], lo que sugiere que células más maduras como las de SP-NK CAR, aun en contexto autólogo y con menor porcentaje de transducción, puedan exhibir un mayor potencial citotóxico, en comparación con células CB-NK CAR alogénicas.

#### 4. LA COMBINACIÓN DEL TRATAMIENTO BTZ+GSI INDUCE SENESCENCIA PREMATURA EN LAS CÉLULAS DE MM RESISTENTES E INCREMENTA SU ANTIGENICIDAD, LO QUE FACILITA SU ELIMINACIÓN POR LAS CÉLULAS NK NKG2D CAR

Suficiente evidencia experimental in vivo ha demostrado la relevancia del receptor NKG2D en la inmunovigilancia de los tumores en donde se observa que el aumento en la expresión de NKG2D-L en las células neoplásicas causa la desaparición de los tumores en el ratón [467, 468]. Los animales deficientes en NKG2D son defectivos en la inmunovigilancia en modelos de neoplasias espontáneas [469]. En humanos, se ha demostrado que muchos tumores aumentan la expresión de NKG2D-L como consecuencia del proceso oncogénico y se vuelven más susceptibles al reconocimiento por células T y NK [470-472]. En MM, se ha reportado previamente el aumento de niveles de NKG2D-L solubles que pueden actuar como señuelo, producir la internalización del

receptor NKG2D, concomitante a una disminución en la expresión de NKG2D-L en membrana, a medida que progresa la enfermedad [119, 122]. En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio indican que la expresión de los NKG2D-L no desaparece y que, al menos uno de los ocho NKG2D-L, se encuentra sobreexpresado en todas las muestras analizadas de pacientes con MM/RR [341]. Estos resultados también se han corroborado en este trabajo (tablas 7 y 8). La elección de la combinación de bortezomib e inhibidores de gamma secretasas (BTZ+GSI) en este estudio está basada en, por una parte, los estudios seminales de Gassner, Soriani y col., en los que se relacionan por primera vez el aumento en la expresión de señales de estrés, como los NKG2D-L, con la inducción de la DDR, cuando se tratan células tumorales y sanas sensibles a estos fármacos con bajas dosis de agentes clastogénicos e irradiación [191, 377]. Soriani y col., además, demostraron que esos fármacos genotóxicos, incluido BTZ, inducían la sobreexpresión de NKG2D-L en células de MM susceptibles y potenciaban la actividad citotóxica de la NK frente al tumor. El mecanismo, estudiado con melfalán y etopósido, resultó dependiente de las quinasas ATM y ATR y ocurría simultáneamente con el establecimiento de un fenotipo senescente inducido por la quimioterapia [414]. Estudios posteriores [411] en células no tumorales fibróticas, confirmaron la relación de la activación de la DDR con el aumento de ligandos de NKG2D, sobre todo MICA y ULBP2, durante el proceso senescente. Por otra parte, Chen y col. mostraron sinergia con la combinación BTZ + GSI-XII en la inducción de apoptosis en células sensibles de MM [369], donde este efecto era dependiente de la inhibición de la actividad del proteasoma y no de la inhibición directa de Notch. Chen y col. no conectaron el posible impacto sinérgico de la combinación BTZ+GSI con el aumento en la expresión de NKG2D-L, la activación de DDR o la potencial inducción de senescencia, pero sí mostraron que la apoptosis inducida podía bloquearse con moléculas anti-oxidantes [369]. En este sentido, hemos mostrado que el tratamiento de células de MM/RR con bortezomib y el inhibidor de gamma secretasas Crenigacestat produce una profunda inhibición de la actividad del proteasoma en células resistentes a BTZ, analizada de forma indirecta por la acumulación de formas poli-ubiquitinadas, que resulta equivalente a la que se produce con el mismo tratamiento con las células sensibles parentales tratadas únicamente con BTZ (Fig. 29A). Nuestros resultados sugieren, a diferencia de los obtenidos por Chen y otros [367], que Crenigacestat en monoterapia no se está comportando como un inhibidor de proteasoma *per se*, sino que está potenciando el efecto inhibitorio de BTZ sobre el proteasoma (Fig. 29A). Este nuevo mecanismo en combinación parece ser dependiente de actividad

proteosoma, porque cuando tratamos de inducirlo en las células que presentan mutación en la subunidad PSMB5, las células RPMI R7, el proteasoma resulta no inhibible (Fig. 29A). Afortunadamente, nuestro grupo ha reportado que la frecuencia de aparición de estas mutaciones en PSMB5 en los pacientes de MM/RR es muy baja [473]. Concomitante a la observación de la inhibición del proteasoma con BTZ+GSI, hemos caracterizado un aumento del daño por dobles roturas en el ADN (Fig. 30A) y el disparo de la DDR en células tratadas con la combinación, donde el eje ATM-Chck2 tiene un papel predominante (Fig. 30B) en el aumento en la expresión de NKG2D-L (Fig. 29B). Chck2 es relevante porque su inhibición específica revierte el fenotipo parcialmente disminuyendo la expresión de NKG2D-L (Fig. 30C). En este sentido, Walker y col. [40] reportaron pérdida de ATM en el 1,3% de las células CD138<sup>+</sup> de pacientes de MM al diagnóstico, por lo que la proteína señalizadora principal de esta ruta no se encuentra en el elenco de las mutaciones más frecuentes en la enfermedad. Estos resultados son consistentes con los obtenidos con el tratamiento en monoterapia con BTZ, ya se ha descrito previamente que es capaz de inducir daño en el ADN señalado por *p*-H2AX [83], activación de la DDR [122], fundamentalmente vía ATR/Chk1 [376], aumento en la expresión de NKG2DL [122] y parada del ciclo celular controlada por p53/p21 [367]. En este sentido, aunque no descartamos el impacto de la activación de otras rutas de señalización descritas para la combinación BTZ+GSI, como son la vía de AKT/mTOR, ERK/MAPK o p38, proponemos la activación de la DDR, como consecuencia del estrés genotóxico acumulado por el tratamiento en combinación, como el mecanismo más plausible para incrementar NKG2D-L y aumentar la inmunogenicidad de las células de MM/RR resistentes. La potenciación de la inhibición de la actividad del proteasoma con Crenigacestat es un mecanismo novedoso ya que los GSI sólo se habían descrito hasta la fecha en inmunoterapia para aumentar la expresión de BCMA en las células de MM, bloqueando su liberación al medio soluble, lo que potencia la eficacia de las terapias anti-BCMA T-CAR [178] y BiTEs [474]. Las gamma secretasas son capaces de inducir el corte de las moléculas de BCMA en membrana, pero nunca se han caracterizado previamente como enzimas de corte y liberación de los NKG2D-L de la membrana. Esta función concreta la realizan las proteínas ADAM10, ADAM17, MMP9, MMP14 y Erp5 con los NKG2D-L [475], por lo que no prevemos que Crenigacestat en monoterapia esté contribuyendo a aumentar los NKG2D-L por este mecanismo. La potenciación de la inhibición de la actividad del proteasoma es un mecanismo que persiste en las células que exhiben una baja expresión de BCMA o no se puede inducir (como NCI R20) o en células

que pueden haber perdido la diana por presión selectiva de la inmunoterapia anti-BCMA (similar a las ARP1 BCMA<sup>KO</sup> R16), así que proponemos esta estrategia como terapia en el contexto de recaída anti-BCMA.

Una de las observaciones más relevantes en nuestros resultados es que la activación de la DDR se asocia a una potente inducción en la expresión de p21, pero no de su activador directo p53 (Fig. 30D). El supresor de tumores p53 es uno de los componentes más estudiados de la DDR. Tras el daño por doble rotura en el ADN, la proteína p53 potencia su estabilidad y se activa al ser fosforilada por ATM. Existen resultados conflictivos previos sobre el impacto de p53 sobre la expresión de NKG2D-L, con datos que muestran un efecto positivo, negativo o neutro. Cabe destacar que BTZ es capaz de inducir p53 en modelos de tumor [367]. Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos por Gasser y col. en líneas celulares humanas y de ratón deficientes en p53, en donde fármacos inductores de estrés genotóxico eran capaces de aumentar la expresión de NKG2D-L. Por el contrario, otros estudios han mostrado que ULBP1 y ULBP2 son dianas transcripcionales directas de p53 [412] o que ULBP2 puede ser reprimida de forma indirecta a través de miARNs que inhiben a p53 [411], como miR-34. Probablemente, esta asociación dependa en gran manera del contexto de su activación, por lo que las funciones atribuidas a p53 en cuanto al control de ciclo celular, aumento en la expresión de NKG2D-L e inducción de apoptosis o senescencia, sean redundantes y pueden establecerse a través de otros inhibidores de ciclo, como p21, añadiendo complejidad a los distintos modelos [405-407].

En el presente estudio se ha reportado una asociación entre el daño en el ADN, activación de la DDR, la sobreexpresión de los NKG2D-L y la inducción del fenotipo senescente (Fig. 30, 29B y 31). La TIS producida por BTZ+GSI, se muestra en línea con lo publicado por Soriani y col. con el tratamiento en monoterapia con agentes clastogénicos como melfalán, etopósido y doxorubicina, como se citó anteriormente [414]. Otros trabajos asocian la acción de quimioterapia genotóxica en monoterapia, con la inducción de senescencia, incluido bortezomib [476]. En este sentido, cabe destacar que la DDR señalizada vía ATM-Chk2 se ha relacionado previamente con la inducción de senescencia inducida por estrés genotóxico en fibroblastos, un modelo de ratón de envejecimiento acelerado [477]. En nuestro modelo de MM resistente a BTZ, las células son completamente refractarias a la inducción de apoptosis por BTZ+GSI (Fig. 31 A y B) pero emerge una oportunidad terapéutica porque somos capaces de inducir la TIS con la

doble combinación (Fig. 31), como ya se ha observado en otras publicaciones con células sensibles utilizando otros fármacos a baja dosis [414]. Es importante resaltar que no hemos observado hematotoxicidad cuando se cocultivaron las células NK NKG2D CAR con PBMC de donantes sanos tratadas con las mismas dosis de BTZ+GSI (Fig. 29E). Trabajos previos han descrito que la TIS también se asocia al aumento de expresión de los NKG2D-L, lo que puede sensibilizarlas a la acción directa de las células NK. Entre los mecanismos más destacados de resistencia a la eliminación por las células NK endógenas inducidos por células senescentes en el microambiente tumoral se encuentran: la liberación de NKG2D-L al medio soluble que pueden actuar como señuelo [197] y el aumento de expresión de moléculas HLA-I no clásicas como HLA-E [280]. El diseño de la combinación contemplado en este estudio permite vulnerar estas resistencias porque: 1) los NKG2D-L solubles no son capaces de bloquear la actividad citotóxica ni de las T-CAR NKG2D [478], ni de las NK-CAR NKG2D (Fig. 20F), y 2) la potenciación de la inhibición de la actividad proteosoma mediante BTZ+GSI disminuye los niveles de HLA-E (Fig. 31 I), como ya se había observado con el tratamiento con BTZ en monoterapia sobre un modelo tumoral sensible [90].

Los resultados en las células en las que se ha inducido la TIS con la doble combinación revelan una inducción paradójica de la ruta de NF- $\kappa$ B (Fig. 31F), que también han reflejado otros trabajos previos [367, 479]. El conflicto radica en que: 1) Crenigacestat se ha caracterizado como inhibidor de Notch [480] y Notch activa la ruta de NF- $\kappa$ B [481], y 2) se ha reportado previamente que BTZ produce la inactivación de la ruta canónica NF- $\kappa$ B a través del bloqueo de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  [81]. En este sentido, se conoce que NF- $\kappa$ B es una de las rutas inflamatorias principales relacionadas con la inducción de la senescencia [391] y la generación de SASP [392], y que la activación de la DDR vía ATM/Chk2 media la liberación de SASP precisamente activando la ruta de NF- $\kappa$ B [482]. Estos resultados sugieren que el fenotipo senescente obtenido por la combinación BTZ+GSI domina sobre la inhibición de las rutas previamente descritas que inducen los fármacos por separado.

Durante el estudio in vivo sobre el efecto de la doble combinación BTZ+GSI hemos encontrado una limitación importante, porque no hemos podido obtener células U266 BCMA<sup>KO</sup> resistentes a altas concentraciones de BTZ por presión selectiva en cultivo. Su consecución hubiera permitido la comparación isogénica directa en cuanto a la eficacia, con la obtenida con las células NK-CAR en monoterapia. No obstante, en el modelo

ARP1 BCMA<sup>KO</sup> R16, que parte de una línea celular refractaria de base a la actividad NK (bajos niveles de NKG2D-L, niveles elevados de HLA-I), hemos podido reproducir los resultados observados in vitro en términos de eficacia de la combinación BTZ+GSI, sin impacto en la mortalidad de los ratones (Fig. 32), lo que puede aumentar la predictibilidad del estudio de la terapia en combinación.

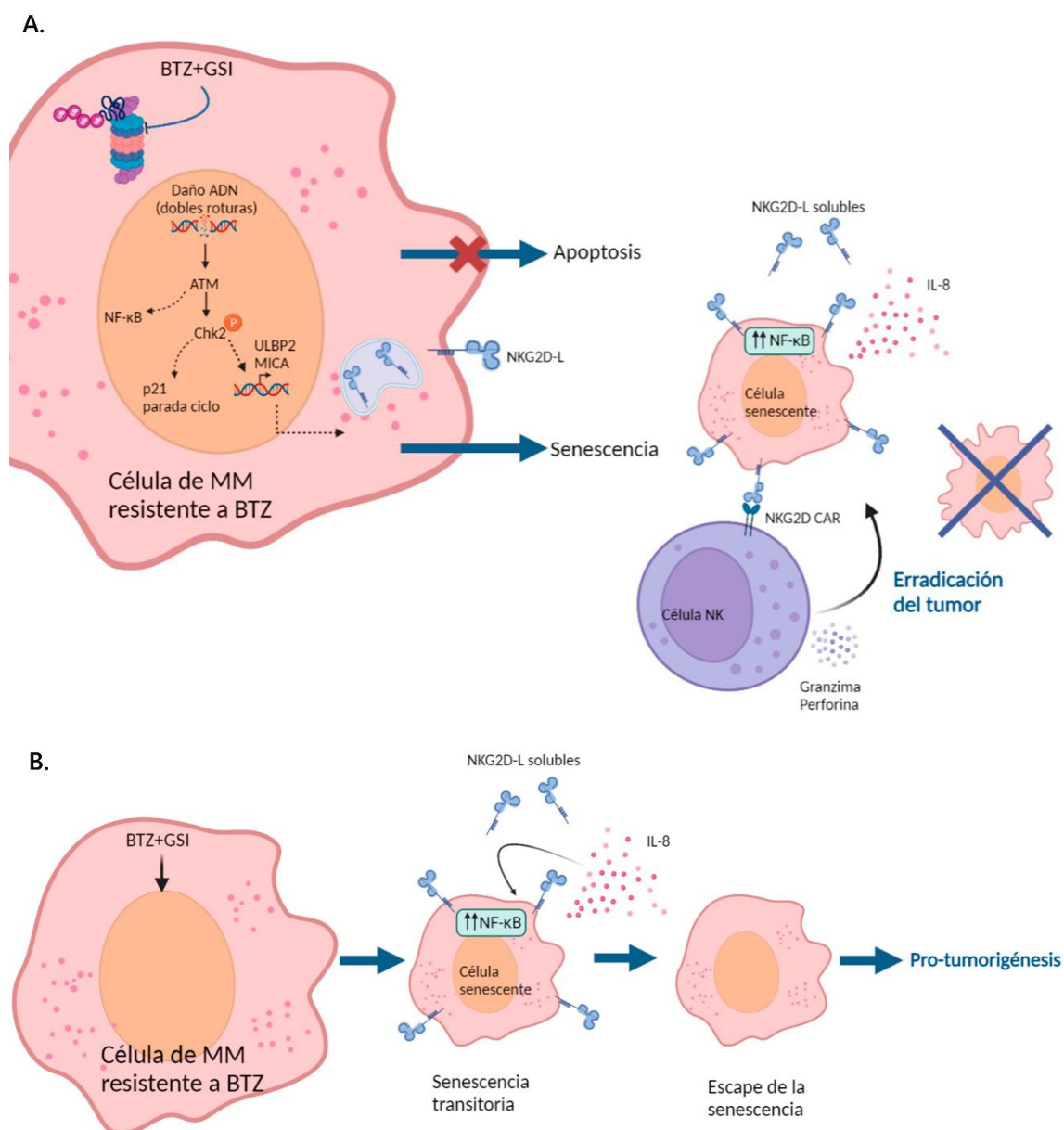
En el ensayo de ratón (Fig. 32), no se han extraído células tumorales para el estudio de la senescencia in vivo, porque los aspirados de médula en animales vivos impactan sobre el desarrollo del MM ARP1 en el animal e interaccionan sobre el análisis de la carga tumoral por BLI. El tratamiento con BTZ+GSI induce la producción de IL-8 in vitro en nuestro modelo, 72 horas después del tratamiento con la combinación y concomitante a la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B y aparición del fenotipo senescente (Figura 31H). Se ha reportado previamente que la TIS puede inducir la liberación de SASP y desencadenar los efectos pro-tumorales previamente descritos en MM/RR, como la resistencia a fármacos y una mayor agresividad de la enfermedad [383]. Desafortunadamente, la técnica por citometría utilizada en este estudio no permitió determinar el perfil SASP en el plasma de los animales del modelo MM ARP1 resistente, por falta de sensibilidad, en respuesta a la TIS inducida por nuestra combinación a las 72 horas. Los niveles de IL-6 e IL-8 solubles en el plasma de los ratones se situaban por debajo del límite de detección (1,81 pg/ml para IL-6 y 3,97 pg/ml para IL-8). Sólo pudimos caracterizar una tendencia en el aumento en la expresión de IL-10 (datos no mostrados), que debe ser confirmada en un nuevo experimento con diseño experimental orientado a este objetivo, con punto final a las 72 horas del tratamiento en combinación. Finalmente, hemos podido determinar en nuestros resultados in vivo con la combinación BTZ+GSI, que el balance neto entre el efecto senolítico de las células NK CAR y el posible efecto pro-tumorigénico de la inducción del SASP sobre las células mielomatosas que no han sido eliminadas, resulta en un aumento significativo de la supervivencia de los animales, pero estos animales tratados terminan sucumbiendo (Fig. 32). Debido al posible efecto protumoral del SASP podemos anticipar en líneas de trabajo futuras la optimización de la combinación terapéutica con la que se ha realizado este trabajo, adicionando fármacos senomórficos que bloqueen su acción. Por ejemplo, inhibiendo la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B, como la metformina o la apigenina, disminuyendo la señalización de NF- $\kappa$ B y mTOR, como la rapamicina; inhibiendo las quinasas JAK1/JAK2 y ROCK, como ruxolitinib, neutralizando directamente la IL-6 o IL-8, como el anticuerpo monoclonal siltuximab, o

disminuyendo la producción de IL-6 e IL-8, resultado del bloqueo del receptor de IL-1, mecanismo que se ha descrito para el péptido antagonista inmunomodulador Anakinra.

En las condiciones de pretratamiento con BTZ+ GSI e inducción de senescencia, las células NKG2D CAR se comportan como un tratamiento senolítico. Desde nuestro conocimiento, este trabajo es la primera descripción de senólisis con células NK-CAR. Amor y col. [431] han publicado recientemente el primer trabajo pionero en este campo, en el que la inmunoterapia senolítica T-CAR anti-uPAR consigue eliminar células senescentes en un modelo de adenocarcinoma de pulmón Kras<sup>G12D</sup> en el que se ha inducido la TIS. uPAR/CD87 es el receptor del activador de plasminógeno tipo-uroquinasa (uPA). Este receptor promueve la degradación de la matriz extracelular durante la tumorigénesis, facilitando la motilidad, invasión y supervivencia de las células tumorales. uPAR soluble forma parte del SASP. Ambas formas se sobreexpresan en células plasmáticas patológicas de MM, donde la forma soluble puede predecir progresión [483, 484]. uPAR exhibe un perfil de expresión amplio en células senescentes y tumorales, pero prevemos que menor que los NKG2D-L como diana. Además, se ha detectado baja expresión de uPAR en epitelio bronquial, en el sistema monocito-macrofágico y en neutrófilos, por lo que este tratamiento podría resultar mieloablativo. Dado el perfil de seguridad mostrado de las células NK CAR NKG2D, proponemos este tratamiento como alternativa a la senólisis de las células T CAR anti-uPAR para eliminar un amplio espectro de células tumorales en las que se ha inducido la TIS.

Tomados en conjunto, establecemos un modelo en que el tratamiento con BTZ+ GSI logra sensibilizar a las células resistentes de MM/RR a las células NK CAR NKG2D, porque induce daño en el ADN, activación de la DDR, fundamentalmente vía ATM-Chk2 y una sobreexpresión de los NKG2D-L en un contexto senescente, que facilita la eliminación de estas células a través del reconocimiento del CAR de NKG2D por parte de las células NK (Fig. 33).





**Figura 33. Mecanismo de acción propuesto de bortezomib en combinación con inhibidores de gamma secretasas sobre células de MM resistentes.**

A) El tratamiento BTZ+GSI provoca estrés genotóxico que se refleja en una producción de dobles roturas en el ADN de la célula que, a su vez, induce la parada de ciclo y el aumento en la expresión en membrana de NKG2D-L. La acumulación de daño no reparable no desencadena apoptosis, que se encuentra bloqueada en las células resistentes, sino que, por el contrario, dispara la senescencia en la célula. El incremento en la expresión de NKG2D-L en las células senescentes de MM aumenta su susceptibilidad al ataque por las células NK a través del reconocimiento del CAR NKG2D. B) La inducción de senescencia en estas células, en ausencia de tratamiento senolítico NK CAR NKG2D, produce una acumulación de moléculas SASP que facilitan un ambiente inflamatorio pro-tumoral que permite que las células mielomatosas puedan escapar del estado senescente y/o reprogramar a las células tumorales que no han inducido la senescencia.

En resumen, en este estudio se ha comparado por primera vez la eficacia del CAR NKG2D frente al CAR BCMA en el contexto del MM/RR, en células efectoras alogénicas

NK-92 y CB-NK. Hemos demostrado que las células CB-NK presentan eficacia anti-MM cuando expresan cualquiera de los dos CAR, sin signos de toxicidad hematológica in vitro. Sin embargo, la persistencia de la respuesta con el NKG2D CAR es menor que con el BCMA CAR en el modelo de ratón propuesto. Por otra parte, las células NK CAR NKG2D emergen como tratamiento inmunoterápico posible en un modelo de resistencia a bortezomib y resistencia a inmunoterapia anti-BCMA, ya que la combinación del tratamiento BTZ+GSI sobre células resistentes potencia su actividad anti-MM, por lo que puede tener implicaciones relevantes en la inmunoterapia del MM/RR.



## **7. CONCLUSIONES**



Las principales conclusiones extraídas de este trabajo se enumeran a continuación:

1. Las células NK-92MI NKG2D CAR y BCMA CAR presentan una actividad antitumoral superior a las células parentales NK-92MI frente a líneas celulares y células primarias de MM in vitro.
2. La potencia lítica de las células NK-92MI NKG2D CAR no puede ser bloqueada por MICA soluble.
3. La coexpresión de los CAR NKG2D y BCMA en las células NK-92MI no induce una actividad lítica sinérgica, aunque sí cobertura citotóxica in vitro frente a células de MM que expresan NKG2D-L y BCMA.
4. Las células NK-92MI CAR exhiben una actividad lítica in vitro frente a células de MM muy similar a la de las células CB-NK CAR. Sin embargo, la irradiación de las células NK-92MI CAR a dosis clínicas anula por completo su eficacia antitumoral in vivo.
5. La modificación de las células NK-92MI no acondicionadas por irradiación mediante la expresión ectópica de un interruptor suicida y su inducción no asegura el control de la proliferación de las células in vivo.
6. Las células CB-NK CAR no muestran toxicidad hematológica sobre PBMCs de donantes sanos.
7. El tratamiento in vivo con las células CB-NK BCMA CAR supera en eficacia anti-MM a las células CB-NK NKG2D CAR y consigue respuestas persistentes en los animales.
8. El pretratamiento con Bortezomib más Crenigacestat en un modelo de resistencia a BTZ y a terapias anti-BCMA potencia la actividad citolítica de las células CB-NK NKG2D CAR in vitro e in vivo.
9. Los tratamientos con Bortezomib y Crenigacestat a las dosis que sensibilizan a las células de MM no producen toxicidad hematológica sobre PBMCs de donantes sanos.
10. El mecanismo por el que el tratamiento con BTZ más Crenigacestat sensibiliza las células de MM a la lisis por las células NK NKG2D CAR se asocia a la señalización de la respuesta al daño genotóxico en el ADN, mediada por el controlador de ciclo celular Chk2 y por un aumento en la expresión de membrana de los NKG2D-L.

11. La inhibición específica de la activación de Chk2 en las células de MM revierte parcialmente el fenotipo del aumento de la expresión de NKG2D-L en células de MM.
  
12. La combinación Bortezomib más Crenigacestat produce senescencia inducida por tratamiento (TIS) asociada a la respuesta al daño en el ADN en células resistentes de MM.

## 8. BIBLIOGRAFÍA





1. García-Sanz, R., M. Victoria Mateos, and J. Fernando San Miguel, *Mieloma múltiple*. Medicina Clínica, 2007.
2. Kyle, R.A.e.a., *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. Br J Haematol, 2003. **121**(5): p. 749-57.
3. Kyle, R.A., et al., *Clinical course of light-chain smouldering multiple myeloma (idiopathic Bence Jones proteinuria): a retrospective cohort study*. Lancet Haematol, 2014. **1**(1): p. e28-e36.
4. Rajkumar, S.V. and R.A. Kyle, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. Mayo Clinic Proceedings, 2005. **80**(10): p. 1371-1382.
5. Kyle, R.A., *Multiple myeloma: an odyssey of discovery*. 2000. **111**(4): p. 1035-1044.
6. Kyle, R.A. and D.P. Steensma, *History of multiple myeloma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **183**: p. 3-23.
7. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple Myeloma*. 2004. **351**(18): p. 1860-1873.
8. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2022*. CA Cancer J Clin, 2022. **72**(1): p. 7-33.
9. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. Blood, 2008. **111**(6): p. 2962-2972.
10. Bladé, J., R.A. Kyle, and P.R. Greipp, *Presenting Features and Prognosis in 72 Patients With Multiple Myeloma Who Were Younger Than 40 Years*. 1996. **93**(2): p. 345-351.
11. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. Mayo Clinic Proceedings, 2003. **78**(1): p. 21-33.
12. Boffetta, P., et al., *Exposure to ultraviolet radiation and risk of malignant lymphoma and multiple myeloma--a multicentre European case-control study*. Int J Epidemiol, 2008. **37**(5): p. 1080-94.
13. Ichimaru, M., et al., *Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow*. J Natl Cancer Inst, 1982. **69**(2): p. 323-8.
14. Friedman, G.D., *Multiple myeloma: relation to propoxyphene and other drugs, radiation and occupation*. Int J Epidemiol, 1986. **15**(3): p. 424-6.
15. Khuder, S.A. and A.B. Mutgi, *Meta-analyses of multiple myeloma and farming*. 1997. **32**(5): p. 510-516.
16. Maldonado, J.E. and R.A. Kyle, *Familial myeloma. Report of eight families and a study of serum proteins in their relatives*. The American journal of medicine, 1974. **57**(6): p. 875-884.
17. Altieri, A., et al., *Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma*. Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1661-70.
18. Todoerti, K., et al., *DIS3 mutations in multiple myeloma impact the transcriptional signature and clinical outcome*. Haematologica, 2022. **107**(4): p. 921-932.
19. Su, T.H., et al., *Chronic hepatitis B is associated with an increased risk of B-cell non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma*. Aliment Pharmacol Ther, 2019. **49**(5): p. 589-598.
20. Rodríguez-García, A., et al., *Efficacy of Antiviral Treatment in Hepatitis C Virus (HCV)-Driven Monoclonal Gammopathies Including Myeloma*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 797209.
21. Nair, S., et al., *Antigen-mediated regulation in monoclonal gammopathies and myeloma*. JCI Insight, 2018. **3**(8).
22. Nair, S., et al., *Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma*. N Engl J Med, 2016. **374**(6): p. 555-61.
23. Palumbo, A., et al., *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group*. J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2863-9.
24. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol, 2016. **91**(7): p. 719-34.

25. Manier, S., et al., *Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(2): p. 100-113.
26. Kyle, R.A., et al., *Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. N Engl J Med, 2007. **356**(25): p. 2582-90.
27. Kumar, S.K., et al., *Multiple myeloma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17046.
28. Tan, J.L.C., et al., *The second revision of the International Staging System (R2-ISS) stratifies progression-free and overall survival in multiple myeloma: Real world data results in an Australian and New Zealand Population*. 2023. **200**(2): p. e17-e21.
29. D'Agostino, M., et al., *Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project*. 2022. **40**(29): p. 3406-3418.
30. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(5): p. 335-48.
31. Seidl, S., H. Kaufmann, and J. Drach, *New insights into the pathophysiology of multiple myeloma*. Lancet Oncol, 2003. **4**(9): p. 557-64.
32. Visram, A., J. Cook, and R. Warsame, *Smoldering multiple myeloma: evolving diagnostic criteria and treatment strategies*. Hematology, 2021. **2021**(1): p. 673-681.
33. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management*. 2022. **97**(8): p. 1086-1107.
34. Fernández de Larrea, C., et al., *Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage*. Blood Cancer J, 2021. **11**(12): p. 192.
35. Kumar, S.K. and S.V. Rajkumar, *The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. **15**(7): p. 409-421.
36. Cardona-Benavides, I.J., C. de Ramón, and N.C. Gutiérrez, *Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications*. Cells, 2021. **10**(2).
37. Yuregir, O.O., et al., *Detecting methylation patterns of p16, MGMT, DAPK and E-cadherin genes in multiple myeloma patients*. Int J Lab Hematol, 2010. **32**(2): p. 142-9.
38. Amodio, N., et al., *Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation*. Expert Opin Ther Targets, 2017. **21**(1): p. 91-101.
39. Pinto, V., et al., *Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance*. 2020. **12**(2): p. 407.
40. Walker, B.A., et al., *Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma*. J Clin Oncol, 2015. **33**(33): p. 3911-20.
41. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 467-72.
42. Manier, S., et al., *Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 157496.
43. Maiso, P., et al., *Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Multiple Myeloma: Their Role as Active Contributors to Myeloma Progression*. Cancers (Basel), 2021. **13**(11).
44. Hideshima, T., et al., *Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 585-98.
45. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple Myeloma*. 2011. **364**(11): p. 1046-1060.
46. Borrello, I., *Can we change the disease biology of multiple myeloma?* Leuk Res, 2012. **36 Suppl 1**(0 1): p. S3-12.
47. SEER., M.-C.S.F.I., Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>. [Acces 2022 Dec 23].
48. Durie, B.G.M., et al., *Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma*

- without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial.* Lancet, 2017. **389**(10068): p. 519-527.
49. Rajkumar, S.V. and S. Kumar, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment.* Mayo Clin Proc, 2016. **91**(1): p. 101-19.
  50. Dimopoulos, M.A., et al., *Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma.* Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1485-1493.
  51. Oyajobi, B.O., *Multiple myeloma/hypercalcemia.* Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**(Suppl 1): p. S4.
  52. Panaroni, C., A.J. Yee, and N.S. Raje, *Myeloma and Bone Disease.* Current Osteoporosis Reports, 2017. **15**(5): p. 483-498.
  53. Ludwig, H., G. Pohl, and A. Osterborg, *Anemia in multiple myeloma.* Clin Adv Hematol Oncol, 2004. **2**(4): p. 233-41.
  54. Sørrig, R., et al., *Immunoparesis in newly diagnosed Multiple Myeloma patients: Effects on overall survival and progression free survival in the Danish population.* PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0188988.
  55. Cáceres, W., et al., *Anemia and infections in multiple myeloma: supportive therapy.* Bol Asoc Med P R, 2009. **101**(2): p. 50-2.
  56. Jacobson, D.R. and S. Zolla-Pazner, *Immunosuppression and infection in multiple myeloma.* Semin Oncol, 1986. **13**(3): p. 282-90.
  57. Nucci, M. and E. Anaissie, *Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents.* Clin Infect Dis, 2009. **49**(8): p. 1211-25.
  58. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: Every year a new standard?* Hematol Oncol, 2019. **37 Suppl 1**(Suppl 1): p. 62-65.
  59. Mikhael, J.R., et al., *Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013.* Mayo Clin Proc, 2013. **88**(4): p. 360-76.
  60. Hillengass, J., et al., *International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders.* Lancet Oncol, 2019. **20**(6): p. e302-e312.
  61. Terao, T. and K. Matsue, *Progress of modern imaging modalities in multiple myeloma.* International Journal of Hematology, 2022. **115**(6): p. 778-789.
  62. Chantry, A., et al., *Guidelines for the use of imaging in the management of patients with myeloma.* 2017. **178**(3): p. 380-393.
  63. Nau, K.C. and W.D. Lewis, *Multiple myeloma: diagnosis and treatment.* Am Fam Physician, 2008. **78**(7): p. 853-9.
  64. Smith, A., F. Wisloff, and D. Samson, *Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005.* Br J Haematol, 2006. **132**(4): p. 410-51.
  65. Radzevičius, M., et al., *Multiple Myeloma Immunophenotype Related to Chromosomal Abnormalities Used in Risk Assessment.* Diagnostics (Basel), 2022. **12**(9).
  66. Bataille, R., et al., *CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis.* Leuk Res, 2008. **32**(3): p. 379-82.
  67. Paiva, B., et al., *Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients.* Leukemia, 2012. **26**(8): p. 1862-9.
  68. Cowan, A.J., et al., *Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review.* Jama, 2022. **327**(5): p. 464-477.
  69. Delforge, M. and H. Ludwig, *How I manage the toxicities of myeloma drugs.* Blood, 2017. **129**(17): p. 2359-2367.
  70. Heim, C. and M.D. Hartmann, *High-resolution structures of the bound effectors avadomide (CC-122) and iberdomide (CC-220) highlight advantages and limitations of the MsCl4 soaking system.* Acta Crystallogr D Struct Biol, 2022. **78**(Pt 3): p. 290-298.

71. Quach, H., et al., *Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2010. **24**(1): p. 22-32.
72. Corral, L.G., et al., *Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha*. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 380-6.
73. Davies, F.E., et al., *Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma*. *Blood*, 2001. **98**(1): p. 210-6.
74. Jungkuntz-Stier, I., et al., *Modulation of natural killer cell effector functions through lenalidomide/dasatinib and their combined effects against multiple myeloma cells*. *Leukemia & Lymphoma*, 2014. **55**(1): p. 168-176.
75. Fionda, C., et al., *The IMiDs targets IKZF-1/3 and IRF4 as novel negative regulators of NK cell-activating ligands expression in multiple myeloma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(27): p. 23609-30.
76. Kotla, V., et al., *Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2009. **2**(1): p. 36.
77. Ito, T., et al., *Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity*. *Science*, 2010. **327**(5971): p. 1345-50.
78. Laubach, J., P. Richardson, and K. Anderson, *Multiple myeloma*. *Annu Rev Med*, 2011. **62**: p. 249-64.
79. Lipchick, B.C., E.E. Fink, and M.A. Nikiforov, *Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma*. *Pharmacol Res*, 2016. **105**: p. 210-5.
80. Besse, A., et al., *Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma: Head-to-Head Comparison of Currently Available Proteasome Inhibitors*. *Cell Chem Biol*, 2019. **26**(3): p. 340-351.e3.
81. Manasanch, E.E. and R.Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(7): p. 417-433.
82. Nunes, A.T. and C.M. Annunziata, *Proteasome inhibitors: structure and function*. *Semin Oncol*, 2017. **44**(6): p. 377-380.
83. Neri, P., et al., *Bortezomib-induced "BRCAness" sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors*. *Blood*, 2011. **118**(24): p. 6368-79.
84. Amschler, K., et al., *NF- $\kappa$ B Inhibition through Proteasome Inhibition or IKK $\beta$  Blockade Increases the Susceptibility of Melanoma Cells to Cytostatic Treatment through Distinct Pathways*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2010. **130**(4): p. 1073-1086.
85. Hideshima, T., et al., *Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1530-4.
86. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. *Science*, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
87. Nencioni, A., et al., *Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 30-36.
88. Mattingly, L.H., R.A. Gault, and W.J. Murphy, *Use of systemic proteasome inhibition as an immune-modulating agent in disease*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2007. **7**(1): p. 29-34.
89. Shi, J., et al., *Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1309-17.
90. Carlsten, M., et al., *Bortezomib sensitizes multiple myeloma to NK cells via ER-stress-induced suppression of HLA-E and upregulation of DR5*. *Oncoimmunology*, 2019. **8**(2): p. e1534664.
91. Niu, C., et al., *Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and  $\gamma\delta$  T cell-mediated lysis in multiple myeloma*. 2016. **8**(4).
92. Hallett, W.H., et al., *Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition*. *J Immunol*, 2008. **180**(1): p. 163-70.

93. Kozalak, G., et al., *Review on Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma and Potential Role of Emerging Technologies*. 2023. **16**(1): p. 111.
94. Ntanasis-Stathopoulos, I., et al., *Multiple myeloma: Role of autologous transplantation*. *Cancer Treat Rev*, 2020. **82**: p. 101929.
95. Drozd-Sokołowska, J., et al., *Stem cell mobilization in multiple myeloma patients relapsing after previous autologous hematopoietic stem cell transplantation: A multicenter report by the Polish Myeloma Study Group*. 2021. **36**(3): p. 443-453.
96. Attal, M., et al., *Autologous Transplantation for Multiple Myeloma in the Era of New Drugs: A Phase III Study of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM/DFCI 2009 Trial)*. *Blood*, 2015. **126**(23): p. 391-391.
97. Cavo, M., et al., *Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone, with or without bortezomib-lenalidomide-dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study*. *Lancet Haematol*, 2020. **7**(6): p. e456-e468.
98. Kumar, A., et al., *Management of multiple myeloma: a systematic review and critical appraisal of published studies*. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(5): p. 293-304.
99. Gagelmann, N., et al., *Tandem Autologous Stem Cell Transplantation Improves Outcomes in Newly Diagnosed Multiple Myeloma with Extramedullary Disease and High-Risk Cytogenetics: A Study from the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019. **25**(11): p. 2134-2142.
100. Moreau, P., et al., *Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group*. *Lancet Oncol*, 2021. **22**(3): p. e105-e118.
101. Podar, K. and X. Leleu, *Relapsed/Refractory Multiple Myeloma in 2020/2021 and Beyond*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(20).
102. Gandhi, U.H., et al., *Outcomes of patients with multiple myeloma refractory to CD38-targeted monoclonal antibody therapy*. *Leukemia*, 2019. **33**(9): p. 2266-2275.
103. Dimopoulos, M.A., et al., *Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of POLLUX*. *Haematologica*, 2018. **103**(12): p. 2088-2096.
104. Attal, M., et al., *Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study*. *Lancet*, 2019. **394**(10214): p. 2096-2107.
105. Dimopoulos, M.A., et al., *Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma*. 2018. **379**(19): p. 1811-1822.
106. Kumar, S., et al., *Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma*. *Blood*, 2017. **130**(22): p. 2401-2409.
107. Chari, A., et al., *Oral Selinexor–Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma*. 2019. **381**(8): p. 727-738.
108. Podar, K., et al., *Selinexor for the treatment of multiple myeloma*. *Expert Opin Pharmacother*, 2020. **21**(4): p. 399-408.
109. Fisher, J.G., et al., *Selinexor Enhances NK Cell Activation Against Malignant B Cells via Downregulation of HLA-E*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 785635.
110. Hu, F., et al., *Drug resistance biomarker ABCC4 of selinexor and immune feature in multiple myeloma*. *International Immunopharmacology*, 2022. **108**: p. 108722.
111. Markham, A., *Belantamab Mafodotin: First Approval*. *Drugs*, 2020. **80**(15): p. 1607-1613.
112. Vaxman, I., et al., *“Real-life” data of the efficacy and safety of belantamab mafodotin in relapsed multiple myeloma—the Mayo Clinic experience*. *Blood Cancer Journal*, 2021. **11**(12): p. 196.

113. Hagen, P.A. and P. Stiff, *The Role of Salvage Second Autologous Hematopoietic Cell Transplantation in Relapsed Multiple Myeloma*. Biol Blood Marrow Transplant, 2019. **25**(3): p. e98-e107.
114. Dhakal, B., et al., *Salvage second transplantation in relapsed multiple myeloma*. Leukemia, 2021. **35**(4): p. 1214-1217.
115. Minnie, S.A. and G.R. Hill, *Immunotherapy of multiple myeloma*. J Clin Invest, 2020. **130**(4): p. 1565-1575.
116. Dosani, T., et al., *The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of myeloma [corrected] and their uses in immunotherapies*. Blood Cancer J, 2015. **5**(4): p. e306.
117. Jurisic, V., et al., *Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients*. Med Oncol, 2007. **24**(3): p. 312-7.
118. Visram, A., et al., *Relapsed multiple myeloma demonstrates distinct patterns of immune microenvironment and malignant cell-mediated immunosuppression*. Blood Cancer J, 2021. **11**(3): p. 45.
119. Carbone, E., et al., *HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells*. Blood, 2005. **105**(1): p. 251-8.
120. Racanelli, V., et al., *Alterations in the antigen processing-presenting machinery of transformed plasma cells are associated with reduced recognition by CD8+ T cells and characterize the progression of MGUS to multiple myeloma*. Blood, 2010. **115**(6): p. 1185-93.
121. El-Sherbiny, Y.M., et al., *The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8444-9.
122. Jinushi, M., et al., *MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1285-90.
123. Linsley, P.S., et al., *Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors*. Immunity, 1994. **1**(9): p. 793-801.
124. Roeven, M.W., et al., *Immunotherapeutic approaches to treat multiple myeloma*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(4): p. 896-910.
125. Rosenblatt, J., et al., *PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine*. J Immunother, 2011. **34**(5): p. 409-18.
126. Giannopoulos, K., et al., *The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma*. British Journal of Cancer, 2012. **106**(3): p. 546-552.
127. Bonanno, G., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity correlates with immune system abnormalities in multiple myeloma*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 247.
128. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1041-8.
129. Strobl, H. and W. Knapp, *TGF-beta1 regulation of dendritic cells*. Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1283-90.
130. Katz, J.B., A.J. Muller, and G.C. Prendergast, *Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 206-21.
131. Quarona, V., et al., *Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche*. 2015. **1335**(1): p. 10-22.
132. Díaz-Tejedor, A., et al., *Immune System Alterations in Multiple Myeloma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies to Reverse Immunosuppression*. Cancers (Basel), 2021. **13**(6).
133. Valeri, A., et al., *Overcoming tumor resistance mechanisms in CAR-NK cell therapy*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 953849.

134. Caserta, S., et al., *Immune checkpoint inhibitors in multiple myeloma: A review of the literature*. Pathology - Research and Practice, 2020. **216**(10): p. 153114.
135. Guillerey, C., et al., *Chemotherapy followed by anti-CD137 mAb immunotherapy improves disease control in a mouse myeloma model*. JCI Insight, 2019. **5**(14).
136. Gandhi, A.K., et al., *Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.)*. Br J Haematol, 2014. **164**(6): p. 811-21.
137. Mohty, M., et al., *Effects of bortezomib on the immune system: a focus on immune regulation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(10): p. 1416-20.
138. Alonso Fernández, R., et al., *Improving NK Cell Function in Multiple Myeloma with NKTR-255, a Novel Polymer-Conjugated Human IL-15*. Blood Adv, 2022.
139. Xu, W., et al., *Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor  $\alpha$ Su/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma*. Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 3075-86.
140. Dranoff, G., *GM-CSF-based cancer vaccines*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 147-54.
141. Bae, J., et al., *A multiepitope of XBP1, CD138 and CS1 peptides induces myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes in T cells of smoldering myeloma patients*. Leukemia, 2015. **29**(1): p. 218-29.
142. Bae, J., et al., *BCMA peptide-engineered nanoparticles enhance induction and function of antigen-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma: clinical applications*. Leukemia, 2020. **34**(1): p. 210-223.
143. Krejcik, J., et al., *Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma*. Blood, 2016. **128**(3): p. 384-94.
144. Pittari, G., et al., *Restoring Natural Killer Cell Immunity against Multiple Myeloma in the Era of New Drugs*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1444.
145. Lonial, S., et al., *Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study*. Lancet Oncol, 2020. **21**(2): p. 207-221.
146. Noonan, K.A., et al., *Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma*. Sci Transl Med, 2015. **7**(288): p. 288ra78.
147. Berdeja, J.G., et al., *Ciltacabtagene autoleucl, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study*. Lancet, 2021. **398**(10297): p. 314-324.
148. Mateos, M.V., et al., *Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone Versus Bortezomib and Dexamethasone in Patients With Previously Treated Multiple Myeloma: Three-year Follow-up of CASTOR*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2020. **20**(8): p. 509-518.
149. Quarona, V., et al., *CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules*. Cytometry B Clin Cytom, 2013. **84**(4): p. 207-17.
150. de Weers, M., et al., *Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1840-8.
151. Overdijk, M.B., et al., *Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma*. MAbs, 2015. **7**(2): p. 311-21.
152. Spencer, A., et al., *Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of CASTOR*. Haematologica, 2018. **103**(12): p. 2079-2087.



153. Malaer, J.D. and P.A. Mathew, *CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma*. *Am J Cancer Res*, 2017. **7**(8): p. 1637-1641.
154. Allegra, A., et al., *Monoclonal antibodies: potential new therapeutic treatment against multiple myeloma*. 2013. **90**(6): p. 441-468.
155. Dimopoulos, M.A., et al., *Addition of elotuzumab to lenalidomide and dexamethasone for patients with newly diagnosed, transplantation ineligible multiple myeloma (ELOQUENT-1): an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial*. *Lancet Haematol*, 2022. **9**(6): p. e403-e414.
156. Löffler, A., et al., *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 2098-103.
157. Zhou, S., et al., *The landscape of bispecific T cell engager in cancer treatment*. *Biomark Res*, 2021. **9**(1): p. 38.
158. Moreau, P., et al., *Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. *N Engl J Med*, 2022. **387**(6): p. 495-505.
159. Kodama, T., et al., *Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma*. *Mol Cancer Ther*, 2019. **18**(9): p. 1555-1564.
160. Krishnan, A.Y., et al., *Updated Phase 1 Results from MonumentAL-1: First-in-Human Study of Talquetamab, a G Protein-Coupled Receptor Family C Group 5 Member D x CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma*. *Blood*, 2021. **138**: p. 158.
161. Imai, C., et al., *Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2004. **18**(4): p. 676-84.
162. Maher, J., et al., *Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor*. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(1): p. 70-5.
163. Hombach, A.A. and H. Abken, *Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling*. 2011. **129**(12): p. 2935-2944.
164. Chmielewski, M. and H. Abken, *TRUCKs: the fourth generation of CARs*. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. **15**(8): p. 1145-54.
165. Tokarew, N., et al., *Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells*. *British Journal of Cancer*, 2019. **120**(1): p. 26-37.
166. Rafei, H., M. Daher, and K. Rezvani, *Chimeric antigen receptor (CAR) natural killer (NK)-cell therapy: leveraging the power of innate immunity*. *Br J Haematol*, 2021. **193**(2): p. 216-230.
167. Van Oekelen, O., et al., *Neurocognitive and hypokinetic movement disorder with features of parkinsonism after BCMA-targeting CAR-T cell therapy*. *Nature Medicine*, 2021. **27**(12): p. 2099-2103.
168. Cho, S.F., K.C. Anderson, and Y.T. Tai, *Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1821.
169. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 231-64.
170. Nardelli, B., et al., *Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells*. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 198-204.
171. Hahne, M., et al., *APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth*. *J Exp Med*, 1998. **188**(6): p. 1185-90.
172. Moreaux, J., et al., *BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone*. *Blood*, 2004. **103**(8): p. 3148-57.
173. Moreaux, J., et al., *The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature*. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 1021-30.

174. Caraccio, C., et al., *Bispecific Antibodies for Multiple Myeloma: A Review of Targets, Drugs, Clinical Trials, and Future Directions*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 501.
175. Chen, H., et al., *Gene Expression of Gamma Secretase (GS) Complex-Related Proteins, the Enzyme That Sheds B-Cell Maturation Antigen (BCMA), Among Patients with Multiple Myeloma (MM) and Effects of the GS Inhibitor LSN424354 on Solubilized Bcma in MM and Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 5641-5641.
176. Laurent, S.A., et al.,  *$\gamma$ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7333.
177. Sanchez, E., et al., *Soluble B-Cell Maturation Antigen Mediates Tumor-Induced Immune Deficiency in Multiple Myeloma*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(13): p. 3383-97.
178. Pont, M.J., et al.,  *$\gamma$ -Secretase inhibition increases efficacy of BCMA-specific chimeric antigen receptor T cells in multiple myeloma*. *Blood*, 2019. **134**(19): p. 1585-1597.
179. García-Guerrero, E., et al., *ATRA works synergistically with the  $\gamma$ -secretase inhibitor crenigacestat to augment BCMA on multiple myeloma and the efficacy of BCMA-CAR T-cells*. *Haematologica*, 2022.
180. Zhang, J., F. Basher, and J.D. Wu, *NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 97.
181. Allez, M., et al., *CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2346-58.
182. Sáez-Borderías, A., et al., *Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(12): p. 3198-206.
183. Upshaw, J.L., et al., *NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells*. *Nature Immunology*, 2006. **7**(5): p. 524-532.
184. El-Gazzar, A., V. Groh, and T. Spies, *Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer*. *J Immunol*, 2013. **191**(4): p. 1509-15.
185. Girlanda, S., et al., *MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells Costimulates pamidronate-activated gammadelta lymphocytes*. *Cancer Res*, 2005. **65**(16): p. 7502-8.
186. Groh, V., et al., *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(22): p. 12445-50.
187. Borchers, M.T., et al., *NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells*. 2006. **291**(2): p. L222-L231.
188. Champsaur, M. and L.L. Lanier, *Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses*. *Immunol Rev*, 2010. **235**(1): p. 267-85.
189. Ward, J., et al., *HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts*. *Blood*, 2007. **110**(4): p. 1207-14.
190. Lanier, L.L., *NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense*. *Cancer Immunology Research*, 2015. **3**(6): p. 575-582.
191. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*. *Nature*, 2005. **436**(7054): p. 1186-1190.
192. Lee, Y.S., et al., *Downregulation of NKG2DLs by TGF- $\beta$  in human lung cancer cells*. *BMC Immunology*, 2021. **22**(1): p. 44.
193. Xu, L., et al., *Inhibition of IL-6-JAK/Stat3 signaling in castration-resistant prostate cancer cells enhances the NK cell-mediated cytotoxicity via alteration of PD-L1/NKG2D ligand levels*. *Mol Oncol*, 2018. **12**(3): p. 269-286.

194. López-Soto, A., et al., *HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer*. *Oncogene*, 2009. **28**(25): p. 2370-82.
195. Mormino, A., et al., *Histone-deacetylase 8 drives the immune response and the growth of glioma*. *Glia*, 2021. **69**(11): p. 2682-2698.
196. Fionda, C., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 increases NKG2D ligand MICA expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in multiple myeloma cells: role of STAT3*. *J Immunol*, 2013. **190**(12): p. 6662-72.
197. Lu, Y., et al., *Hypoxia-mediated immune evasion of pancreatic carcinoma cells*. *Mol Med Rep*, 2015. **11**(5): p. 3666-3672.
198. Siemens, D.R., et al., *Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4746-53.
199. Zingoni, A., et al., *NKG2D Ligand Shedding in Response to Stress: Role of ADAM10*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 447.
200. Rebmann, V., et al., *Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients*. *Clin Immunol*, 2007. **123**(1): p. 114-20.
201. Klöss, S., et al., *Cetuximab Reconstitutes Pro-Inflammatory Cytokine Secretions and Tumor-Infiltrating Capabilities of sMICA-Inhibited NK Cells in HNSCC Tumor Spheroids*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 543.
202. Zhang, T., A. Barber, and C.L. Sentman, *Generation of Antitumor Responses by Genetic Modification of Primary Human T Cells with a Chimeric NKG2D Receptor*. *Cancer Research*, 2006. **66**(11): p. 5927-5933.
203. Gharbaran, R., *Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015. **94**(1): p. 1-17.
204. Lovell, R., et al., *Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival*. *Br J Haematol*, 2005. **130**(4): p. 542-8.
205. Beauvais, D.M., et al., *Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor*. *J Exp Med*, 2009. **206**(3): p. 691-705.
206. Rapraeger, A.C., *Syndecan-regulated receptor signaling*. *J Cell Biol*, 2000. **149**(5): p. 995-8.
207. Coombe, D.R., *Biological implications of glycosaminoglycan interactions with haemopoietic cytokines*. *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(7): p. 598-607.
208. Casu, B., A. Naggi, and G. Torri, *Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer*. *Matrix Biol*, 2010. **29**(6): p. 442-52.
209. Moreaux, J., et al., *APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop*. *Eur J Haematol*, 2009. **83**(2): p. 119-29.
210. Kind, S., et al., *Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues*. *Dis Markers*, 2019. **2019**: p. 4928315.
211. Piedra-Quintero, Z.L., et al., *CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 597959.
212. Lee, H.C., *Structure and enzymatic functions of human CD38*. *Mol Med*, 2006. **12**(11-12): p. 317-23.
213. An, G., et al., *SAR 650984, a Therapeutic Anti-CD38 Monoclonal Antibody, Blocks CD38-CD31 Interaction in Multiple Myeloma*. *Blood*, 2014. **124**(21): p. 4729-4729.
214. Deaglio, S., et al., *Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells*. *J Immunol*, 1996. **156**(2): p. 727-34.
215. Zambello, R., et al., *NK cells and CD38: Implication for (Immuno)Therapy in Plasma Cell Dyscrasias*. *Cells*, 2020. **9**(3).

216. Atamaniuk, J., et al., *Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma*. Eur J Clin Invest, 2012. **42**(9): p. 953-60.
217. Kim, Y.J., et al., *Comprehensive Transcriptome Profiling of Balding and Non-Balding Scalps in Trichorhinophalangeal Syndrome Type I Patient*. Ann Dermatol, 2017. **29**(5): p. 597-601.
218. Chari, A., et al., *Talquetamab, a T-Cell–Redirecting GPRC5D Bispecific Antibody for Multiple Myeloma*. 2022. **387**(24): p. 2232-2244.
219. Pillarisetti, K., et al., *A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma*. Blood, 2020. **135**(15): p. 1232-1243.
220. Scheuermann, R.H. and E. Racila, *CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy*. Leuk Lymphoma, 1995. **18**(5-6): p. 385-97.
221. Garfall, A.L., et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma*. N Engl J Med, 2015. **373**(11): p. 1040-7.
222. Nerreter, T., et al., *Super-resolution microscopy reveals ultra-low CD19 expression on myeloma cells that triggers elimination by CD19 CAR-T*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3137.
223. Kumaresan, P.R., et al., *CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function*. Mol Immunol, 2002. **39**(1-2): p. 1-8.
224. Guo, H., et al., *Immune Cell Inhibition by SLAMF7 Is Mediated by a Mechanism Requiring Src Kinases, CD45, and SHIP-1 That Is Defective in Multiple Myeloma Cells*. 2015. **35**(1): p. 41-51.
225. Hsi, E.D., et al., *CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2775-84.
226. De Salort, J., et al., *Expression of SLAM (CD150) cell-surface receptors on human B-cell subsets: from pro-B to plasma cells*. Immunol Lett, 2011. **134**(2): p. 129-36.
227. Franco, A., et al., *Human Fc receptor-like 5 binds intact IgG via mechanisms distinct from those of Fc receptors*. J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5739-46.
228. Elkins, K., et al., *FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(10): p. 2222-32.
229. Naor, D., et al., *Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(4): p. 260-7.
230. Screaton, G.R., et al., *The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12235-8.
231. Chopra, A., *Humanized anti-CD44v6 monoclonal antibody labeled with IRDye800CW*, in *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. 2004, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
232. Liebisch, P., et al., *CD44v6, a target for novel antibody treatment approaches, is frequently expressed in multiple myeloma and associated with deletion of chromosome arm 13q*. Haematologica, 2005. **90**(4): p. 489-93.
233. Heider, K.H., et al., *CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(7): p. 567-79.
234. Jung, T., W. Gross, and M. Zöller, *CD44v6 coordinates tumor matrix-triggered motility and apoptosis resistance*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 15862-74.
235. Jijiwa, M., et al., *CD44v6 regulates growth of brain tumor stem cells partially through the AKT-mediated pathway*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24217.
236. Khan, F., et al., *Identification of novel CD44v6-binding peptides that block CD44v6 and deliver a pro-apoptotic peptide to tumors to inhibit tumor growth and metastasis in mice*. Theranostics, 2021. **11**(3): p. 1326-1344.

237. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
238. Shirure, V.S., et al., *CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **308**(1): p. C68-78.
239. Awuah, D., et al., *Developing a Safer Anti-CD44v6 Chimeric Antigen Receptor T Cell Against Hematological Cancers By Mitigating on-Target Off-Tumor Toxicity*. Blood, 2021. **138**: p. 2796.
240. Braumüller, H., et al., *CD44v6 cell surface expression is a common feature of macrophages and macrophage-like cells – implication for a natural macrophage extravasation mechanism mimicked by tumor cells*. 2000. **476**(3): p. 240-247.
241. Bruno, B., et al., *European Myeloma Network perspective on CAR T-Cell therapies for multiple myeloma*. Haematologica, 2021. **106**(8): p. 2054-2065.
242. 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, 2017. **23**(12): p. 1436-1443.
243. Radhakrishnan, S.V., et al., *CD229 CAR T cells eliminate multiple myeloma and tumor propagating cells without fratricide*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 798.
244. Schuster, S.J., et al., *Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. 2018. **380**(1): p. 45-56.
245. Maude, S.L., et al., *Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia*. 2018. **378**(5): p. 439-448.
246. Munshi, N.C., K. Hege, and J. San-Miguel, *Idecabtagene Vicleucel in Relapsed Myeloma*. Reply. N Engl J Med, 2021. **384**(24): p. 2357-2358.
247. Rodriguez-Otero, P. and J.F. San-Miguel, *Cellular therapy for multiple myeloma: what's now and what's next*. Hematology, 2022. **2022**(1): p. 180-189.
248. Gogishvili, T., et al., *SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7(+) normal lymphocytes*. Blood, 2017. **130**(26): p. 2838-2847.
249. Drent, E., et al., *A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization*. Mol Ther, 2017. **25**(8): p. 1946-1958.
250. Smith, E.L., et al., *GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells*. Sci Transl Med, 2019. **11**(485).
251. Casucci, M., et al., *CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma*. Blood, 2013. **122**(20): p. 3461-72.
252. Loney, C., et al., *Study protocol for THINK: a multinational open-label phase I study to assess the safety and clinical activity of multiple administrations of NKR-2 in patients with different metastatic tumour types*. BMJ Open, 2017. **7**(11): p. e017075.
253. Baumeister, S.H., et al., *Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma*. Cancer Immunol Res, 2019. **7**(1): p. 100-112.
254. Ali, S.A., et al., *T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma*. Blood, 2016. **128**(13): p. 1688-1700.
255. Cohen, A.D., et al., *B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma*. J Clin Invest, 2019. **129**(6): p. 2210-2221.
256. D'Agostino, M. and N. Raje, *Anti-BCMA CAR T-cell therapy in multiple myeloma: can we do better?* Leukemia, 2020. **34**(1): p. 21-34.
257. Fernández de Larrea, C., et al., *Defining an Optimal Dual-Targeted CAR T-cell Therapy Approach Simultaneously Targeting BCMA and GPRC5D to Prevent BCMA Escape-Driven Relapse in Multiple Myeloma*. Blood Cancer Discov, 2020. **1**(2): p. 146-154.
258. Li, C., et al., *A Bispecific CAR-T Cell Therapy Targeting Bcma and CD38 for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Phase 1 Dose-Climbing Trial*. Blood, 2019. **134**: p. 930.

259. Jiang, H., et al., *Clinical Results of a Multicenter Study of the First-in-Human Dual BCMA and CD19 Targeted Novel Platform Fast CAR-T Cell Therapy for Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma*. Blood, 2020. **136**: p. 25-26.
260. Chen, D., et al., *Subsequent anti-myeloma therapy after maturation antigen (BCMA) chimeric antigen receptor (CAR)-T cell (HDS269B) treatment in patients with relapsed/refractory multiple myeloma*. 2022. **97**(12): p. E478-E481.
261. Van Oekelen, O., et al., *Interventions and outcomes of multiple myeloma patients receiving salvage treatment after BCMA-directed CAR T therapy*. Blood, 2022.
262. Mailankody, S. and O. Landgren, *T-Cell Engagers - Modern Immune-Based Therapies for Multiple Myeloma*. N Engl J Med, 2022. **387**(6): p. 558-561.
263. Morris, E.C., et al., *Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2022. **22**(2): p. 85-96.
264. Hines, M.R., et al., *Hemophagocytic lymphohistiocytosis-like toxicity (carHLH) after CD19-specific CAR T-cell therapy*. Br J Haematol, 2021. **194**(4): p. 701-707.
265. Sun, S., et al., *Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 2386187.
266. Ruella, M., et al., *Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell*. Nat Med, 2018. **24**(10): p. 1499-1503.
267. Sanber, K., B. Savani, and T. Jain, *Graft-versus-host disease risk after chimeric antigen receptor T-cell therapy: the diametric opposition of T cells*. 2021. **195**(5): p. 660-668.
268. Liu, E., et al., *Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors*. N Engl J Med, 2020. **382**(6): p. 545-553.
269. Caruso, S., et al., *Safe and effective off-the-shelf immunotherapy based on CAR-CD123-NK cells for the treatment of acute myeloid leukaemia*. J Hematol Oncol, 2022. **15**(1): p. 163.
270. Zhang, Y., et al., *In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection*. 2007. **121**(2): p. 258-265.
271. Burga, R.A., et al., *Improving efficacy of cancer immunotherapy by genetic modification of natural killer cells*. Cytotherapy, 2016. **18**(11): p. 1410-1421.
272. Klingemann, H., *Are natural killer cells superior CAR drivers?* Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e28147.
273. Glienke, W., et al., *Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 21.
274. Sivori, S., et al., *NK Cell-Based Immunotherapy for Hematological Malignancies*. J Clin Med, 2019. **8**(10).
275. Luetke-Eversloh, M., M. Killig, and C. Romagnani, *Signatures of human NK cell development and terminal differentiation*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 499.
276. Cichocki, F., et al., *Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 55.
277. Malmberg, K.J., et al., *Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer*. Semin Immunol, 2017. **31**: p. 20-29.
278. Freud, A.G., et al., *The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity*. Immunity, 2017. **47**(5): p. 820-833.
279. Wu, X. and S. Matosevic, *Gene-edited and CAR-NK cells: Opportunities and challenges with engineering of NK cells for immunotherapy*. Mol Ther Oncolytics, 2022. **27**: p. 224-238.
280. Pereira, B.I., et al., *Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8(+) T cell inhibition*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2387.
281. Shimasaki, N., A. Jain, and D. Campana, *NK cells for cancer immunotherapy*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(3): p. 200-218.
282. Halle, S., O. Halle, and R. Förster, *Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo*. Trends Immunol, 2017. **38**(6): p. 432-443.

283. Ljunggren, H.G. and K. Kärre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
284. Morvan, M.G. and L.L. Lanier, *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(1): p. 7-19.
285. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
286. Bottino, C., et al., *Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 557-67.
287. Ochoa, M.C., et al., *Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells*. Immunol Cell Biol, 2017. **95**(4): p. 347-355.
288. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
289. Campbell, K.S. and A.K. Purdy, *Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations*. Immunology, 2011. **132**(3): p. 315-25.
290. Tremblay-LeMay, R., N. Rastgoo, and H. Chang, *Modulating PD-L1 expression in multiple myeloma: an alternative strategy to target the PD-1/PD-L1 pathway*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 46.
291. Solinas, C., et al., *Programmed cell death-ligand 2: A neglected but important target in the immune response to cancer?* Translational Oncology, 2020. **13**(10): p. 100811.
292. Zhou, X.M., et al., *Intrinsic Expression of Immune Checkpoint Molecule TIGIT Could Help Tumor Growth in vivo by Suppressing the Function of NK and CD8(+) T Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2821.
293. Prager, I. and C. Watzl, *Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity*. J Leukoc Biol, 2019. **105**(6): p. 1319-1329.
294. Guillerey, C., N.D. Huntington, and M.J. Smyth, *Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy*. Nat Immunol, 2016. **17**(9): p. 1025-36.
295. Wang, W., et al., *NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 368.
296. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
297. Zhang, L., et al., *CAR-NK cells for cancer immunotherapy: from bench to bedside*. Biomark Res, 2022. **10**(1): p. 12.
298. Alnabhan, R., A. Madrigal, and A. Saudemont, *Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines*. Cytotherapy, 2015. **17**(1): p. 73-85.
299. Tarannum, M., R. Romee, and R.M. Shapiro, *Innovative Strategies to Improve the Clinical Application of NK Cell-Based Immunotherapy*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 859177.
300. Cichocki, F., et al., *Quadruple gene-engineered natural killer cells enable multi-antigen targeting for durable antitumor activity against multiple myeloma*. Nature Communications, 2022. **13**(1): p. 7341.
301. Spanholtz, J., et al., *High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9221.
302. Wang, W.N., G.Y. Zhou, and W.L. Zhang, *NK-92 cell, another ideal carrier for chimeric antigen receptor*. Immunotherapy, 2017. **9**(9): p. 753-765.
303. Tonn, T., et al., *Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(4): p. 535-44.
304. Albinger, N., J. Hartmann, and E. Ullrich, *Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany*. Gene Therapy, 2021. **28**(9): p. 513-527.
305. Klingemann, H.G., E. Wong, and G. Maki, *A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood*. Biol Blood Marrow Transplant, 1996. **2**(2): p. 68-75.

306. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. *Leukemia*, 1994. **8**(4): p. 652-8.
307. Jochems, C., et al., *An NK cell line (haNK) expressing high levels of granzyme and engineered to express the high affinity CD16 allele*. *Oncotarget*, 2016. **7**(52): p. 86359-86373.
308. Chen, Y., et al., *Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB- $\zeta$  or CD64-BB- $\zeta$  receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody*. *Oncotarget*, 2017. **8**(23): p. 37128-37139.
309. Fabian, K.P., et al., *PD-L1 targeting high-affinity NK (t-haNK) cells induce direct antitumor effects and target suppressive MDSC populations*. *J Immunother Cancer*, 2020. **8**(1).
310. Ernst, D., et al., *Humanized anti-CD123 antibody facilitates NK cell antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of Hodgkin lymphoma targets via ARF6/PLD-1*. *Blood Cancer J*, 2019. **9**(2): p. 6.
311. Friedman, J., et al., *Inhibition of WEE1 kinase and cell cycle checkpoint activation sensitizes head and neck cancers to natural killer cell therapies*. *J Immunother Cancer*, 2018. **6**(1): p. 59.
312. Jochems, C., et al., *ADCC employing an NK cell line (haNK) expressing the high affinity CD16 allele with avelumab, an anti-PD-L1 antibody*. *Int J Cancer*, 2017. **141**(3): p. 583-593.
313. Maki, G., et al., *Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. **10**(3): p. 369-83.
314. Faure, M. and E.O. Long, *KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6208-14.
315. Yan, Y., et al., *Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(11): p. 2859-68.
316. Tam, Y.K., et al., *Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(8): p. 1359-73.
317. Schwartz, R.N., L. Stover, and J.P. Dutcher, *Managing toxicities of high-dose interleukin-2*. *Oncology (Williston Park)*, 2002. **16**(11 Suppl 13): p. 11-20.
318. Tam, Y.K., et al., *Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92*. *J Hematother*, 1999. **8**(3): p. 281-90.
319. Jiang, H., et al., *Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells*. *Mol Oncol*, 2014. **8**(2): p. 297-310.
320. 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*, 2014. **28**(4): p. 917-27.
321. Palaiologou, M., I. Delladetsima, and D. Tiniakos, *CD138 (syndecan-1) expression in health and disease*. *Histol Histopathol*, 2014. **29**(2): p. 177-89.
322. Manon-Jensen, T., Y. Itoh, and J.R. Couchman, *Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding*. 2010. **277**(19): p. 3876-3889.
323. Hambach, J., et al., *Targeting CD38-Expressing Multiple Myeloma and Burkitt Lymphoma Cells In Vitro with Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptors (Nb-CARs)*. *Cells*, 2020. **9**(2).
324. Zhang, G., et al., *Retargeting NK-92 for anti-melanoma activity by a TCR-like single-domain antibody*. *Immunol Cell Biol*, 2013. **91**(10): p. 615-24.
325. Tonn, T., et al., *Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92*. *Cytotherapy*, 2013. **15**(12): p. 1563-70.
326. Arai, S., et al., *Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial*. *Cytotherapy*, 2008. **10**(6): p. 625-32.



327. Williams, B.A., et al., *A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy*. *Oncotarget*, 2017. **8**(51): p. 89256-89268.
328. Boyiadzis, M., et al., *Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia*. *Cytotherapy*, 2017. **19**(10): p. 1225-1232.
329. 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*, 2018. **8**(6): p. 1083-1089.
330. Kotylo, P.K., et al., *Rapid analysis of lymphocyte subsets in cord blood*. *Am J Clin Pathol*, 1990. **93**(2): p. 263-6.
331. Sarvaria, A., et al., *Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications*. 2017. **8**.
332. Luevano, M., et al., *The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation*. *Human Immunology*, 2012. **73**(3): p. 248-257.
333. Li, L., et al., *A novel immature natural killer cell subpopulation predicts relapse after cord blood transplantation*. *Blood Adv*, 2019. **3**(23): p. 4117-4130.
334. Zhao, X., et al., *Cord-Blood Natural Killer Cell-Based Immunotherapy for Cancer*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 584099.
335. Gaddy, J., G. Risdon, and H.E. Broxmeyer, *Cord blood natural killer cells are functionally and phenotypically immature but readily respond to interleukin-2 and interleukin-12*. *J Interferon Cytokine Res*, 1995. **15**(6): p. 527-36.
336. Liu, E., et al., *GMP-Compliant Universal Antigen Presenting Cells (uAPC) Promote the Metabolic Fitness and Antitumor Activity of Armored Cord Blood CAR-NK Cells*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 626098.
337. Boissel, L., et al., *Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens*. *Leuk Lymphoma*, 2012. **53**(5): p. 958-65.
338. 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*, 2018. **32**(2): p. 520-531.
339. Du, W., et al., *Generation of universal natural killer cells from a cryopreserved cord blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cell library*. 2022. **12**(10): p. 1771-1781.
340. Nham, T., et al., *Ex Vivo-expanded Natural Killer Cells Derived From Long-term Cryopreserved Cord Blood are Cytotoxic Against Primary Breast Cancer Cells*. *J Immunother*, 2018. **41**(2): p. 64-72.
341. Leivas, A., et al., *NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma*. *Blood Cancer J*, 2021. **11**(8): p. 146.
342. Ng, Y.Y., et al., *CXCR4 and anti-BCMA CAR co-modified natural killer cells suppress multiple myeloma progression in a xenograft mouse model*. *Cancer Gene Therapy*, 2022. **29**(5): p. 475-483.
343. Roex, G., et al., *Two for one: targeting BCMA and CD19 in B-cell malignancies with off-the-shelf dual-CAR NK-92 cells*. *J Transl Med*, 2022. **20**(1): p. 124.
344. Wang, X., et al., *Inducible MyD88/CD40 synergizes with IL-15 to enhance antitumor efficacy of CAR-NK cells*. *Blood Adv*, 2020. **4**(9): p. 1950-1964.
345. Bachiller, M., et al., *NK cells enhance CAR-T cell antitumor efficacy by enhancing immune/tumor cells cluster formation and improving CAR-T cell fitness*. *J Immunother Cancer*, 2021. **9**(8).

346. Clara, J.A., et al., *High-affinity CD16 integration into a CRISPR/Cas9-edited CD38 locus augments CD38-directed antitumor activity of primary human natural killer cells*. *J Immunother Cancer*, 2022. **10**(2).
347. Naeimi Kararoudi, M., et al., *CD38 deletion of human primary NK cells eliminates daratumumab-induced fratricide and boosts their effector activity*. *Blood*, 2020. **136**(21): p. 2416-2427.
348. Cichocki, F., et al., *GSK3 Inhibition Drives Maturation of NK Cells and Enhances Their Antitumor Activity*. *Cancer Res*, 2017. **77**(20): p. 5664-5675.
349. Afolabi, L.O., et al., *Synergistic Tumor Cytolysis by NK Cells in Combination With a Pan-HDAC Inhibitor, Panobinostat*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 701671.
350. Ma, R., et al., *An Oncolytic Virus Expressing IL15/IL15R $\alpha$  Combined with Off-the-Shelf EGFR-CAR NK Cells Targets Glioblastoma*. *Cancer Res*, 2021. **81**(13): p. 3635-3648.
351. Liu, W.N., et al., *Successful targeting of PD-1/PD-L1 with chimeric antigen receptor-natural killer cells and nivolumab in a humanized mouse cancer model*. 2022. **8**(47): p. eadd1187.
352. Zhang, C., et al., *Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity*. *J Immunother Cancer*, 2021. **9**(10).
353. Laskowski, T.J., A. Biederstädt, and K. Rezvani, *Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2022. **22**(10): p. 557-575.
354. Alsina, M., et al., *Updated Results from the Phase I CRB-402 Study of Anti-Bcma CAR-T Cell Therapy bb21217 in Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: Correlation of Expansion and Duration of Response with T Cell Phenotypes*. *Blood*, 2020. **136**(Supplement 1): p. 25-26.
355. Zhao, G., et al., *Lenalidomide enhances the efficacy of anti-BCMA CAR-T treatment in relapsed/refractory multiple myeloma: a case report and reviews of the literature*. *Cancer Immunol Immunother*, 2022. **71**(1): p. 39-44.
356. Lagrue, K., et al., *Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds*. *Blood*, 2015. **126**(1): p. 50-60.
357. Skov, S., et al., *Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 11136-45.
358. Cho, H., et al., *Differential Effects of Histone Deacetylases on the Expression of NKG2D Ligands and NK Cell-Mediated Anticancer Immunity in Lung Cancer Cells*. *Molecules*, 2021. **26**(13).
359. Wang, F., et al., *Combined treatment with anti-PSMA CAR NK-92 cell and anti-PD-L1 monoclonal antibody enhances the antitumour efficacy against castration-resistant prostate cancer*. *Clin Transl Med*, 2022. **12**(6): p. e901.
360. Cowan, A.J., et al., *Efficacy and Safety of Fully Human Bcma CAR T Cells in Combination with a Gamma Secretase Inhibitor to Increase Bcma Surface Expression in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. *Blood*, 2019. **134**: p. 204.
361. Mancarella, S., et al., *Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis*. *Cell Death Differ*, 2020. **27**(8): p. 2330-2343.
362. Shariat Razavi, S.M., et al., *MAML1 regulates EMT markers expression through NOTCH-independent pathway in breast cancer cell line MCF7*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019. **510**(3): p. 376-382.
363. Doi, T., et al., *A phase 1 study of crenigacestat (LY3039478), the Notch inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors*. *Invest New Drugs*, 2021. **39**(2): p. 469-476.

364. Borthakur, G., et al., *Phase 1 study to evaluate Crenigacestat (LY3039478) in combination with dexamethasone in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma*. *Cancer*, 2021. **127**(3): p. 372-380.
365. Imbimbo, B.P., *Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators*. *Curr Top Med Chem*, 2008. **8**(1): p. 54-61.
366. Searfoss, G.H., et al., *Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 46107-16.
367. Biskup, E., et al., *Proteasome inhibition as a novel mechanism of the proapoptotic activity of  $\gamma$ -secretase inhibitor I in cutaneous T-cell lymphoma*. *Br J Dermatol*, 2013. **168**(3): p. 504-12.
368. Wang, M., et al., *Down-regulation of Notch1 by gamma-secretase inhibition contributes to cell growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells A2780*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **393**(1): p. 144-9.
369. Chen, F., et al., *Gamma-secretase inhibitor enhances the cytotoxic effect of bortezomib in multiple myeloma*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011. **34**(6): p. 545-51.
370. Meng, X., et al., *GSI-I (Z-LLNle-CHO) inhibits  $\gamma$ -secretase and the proteasome to trigger cell death in precursor-B acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2011. **25**(7): p. 1135-1146.
371. Dang, Q., et al., *The  $\gamma$ -secretase inhibitor GSI-I interacts synergistically with the proteasome inhibitor bortezomib to induce ALK+ anaplastic large cell lymphoma cell apoptosis*. *Cell Signal*, 2019. **59**: p. 76-84.
372. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 39-85.
373. Stucki, M. and S.P. Jackson, *gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes*. *DNA Repair (Amst)*, 2006. **5**(5): p. 534-43.
374. d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. *Nature Reviews Cancer*, 2008. **8**(7): p. 512-522.
375. Ouellette, M.M., S. Zhou, and Y. Yan, *Cell Signaling Pathways That Promote Radioresistance of Cancer Cells*. 2022. **12**(3): p. 656.
376. Hong, Y.S., et al., *Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1*. *Int J Oncol*, 2012. **41**(1): p. 76-82.
377. Gasser, S. and D.H. Raulet, *Activation and self-tolerance of natural killer cells*. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 130-42.
378. Clara, J.A., et al., *Cell Density of NK Cells during Ex Vivo Expansion Impacts NK Cell Surface TRAIL Expression*. *Blood*, 2020. **136**(Supplement 1): p. 5-6.
379. Zhang, Q., et al., *Bortezomib improves adoptive carbonic anhydrase IX-specific chimeric antigen receptor-modified NK92 cell therapy in mouse models of human renal cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2018. **40**(6): p. 3714-3724.
380. Lee, S., et al., *Virus-induced senescence is a driver and therapeutic target in COVID-19*. *Nature*, 2021. **599**(7884): p. 283-289.
381. Muñoz-Espín, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(7): p. 482-96.
382. Fitsiou, E., A. Soto-Gamez, and M. Demaria, *Biological functions of therapy-induced senescence in cancer*. *Seminars in Cancer Biology*, 2022. **81**: p. 5-13.
383. Guillon, J., et al., *Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity*. *Cell Cycle*, 2019. **18**(19): p. 2385-2397.
384. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(5): p. 961-76.
385. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. *Aging Cell*, 2006. **5**(2): p. 187-95.
386. Mirzayans, R., et al., *New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 170325.

387. Gire, V. and V. Dulic, *Senescence from G2 arrest, revisited*. Cell Cycle, 2015. **14**(3): p. 297-304.
388. Coppé, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
389. Davalos, A.R., et al., *Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 273-83.
390. Stoczynska-Fidelus, E., et al., *Role of Senescence in Tumorigenesis and Anticancer Therapy*. Journal of Oncology, 2022. **2022**: p. 5969536.
391. Freund, A., C.K. Patil, and J. Campisi, *p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype*. Embo j, 2011. **30**(8): p. 1536-48.
392. Sikora, E., G. Mosieniak, and M.A. Sliwinska, *Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells*. Curr Drug Targets, 2016. **17**(4): p. 377-87.
393. Stagni, V., et al., *ATM Kinase-Dependent Regulation of Autophagy: A Key Player in Senescence?* Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 599048.
394. Teo, Y.V., et al., *Notch Signaling Mediates Secondary Senescence*. Cell Rep, 2019. **27**(4): p. 997-1007.e5.
395. Xu, M., et al., *JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(46): p. E6301-10.
396. Guo, Q., et al., *STING promotes senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the NF- $\kappa$ B signaling pathway*. Cell Death & Disease, 2021. **12**(1): p. 13.
397. Ortiz-Montero, P., A. Londoño-Vallejo, and J.P. Vernot, *Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line*. Cell Commun Signal, 2017. **15**(1): p. 17.
398. Park, J.H., et al., *Pharmacological inhibition of mTOR attenuates replicative cell senescence and improves cellular function via regulating the STAT3-PIM1 axis in human cardiac progenitor cells*. Experimental & Molecular Medicine, 2020. **52**(4): p. 615-628.
399. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(20): p. 1536-46.
400. Wang, L., L. Lankhorst, and R. Bernards, *Exploiting senescence for the treatment of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2022. **22**(6): p. 340-355.
401. Vergel, M., et al., *Cellular senescence as a target in cancer control*. J Aging Res, 2010. **2011**: p. 725365.
402. Tang, H., et al., *Low dose dinaciclib enhances doxorubicin-induced senescence in myeloma RPMI8226 cells by transformation of the p21 and p16 pathways*. Oncol Lett, 2018. **16**(5): p. 6608-6614.
403. Park, J.I., et al., *Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(8): p. 455-60.
404. Duy, C., et al., *Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating AML Recurrence*. Cancer Discov, 2021. **11**(6): p. 1542-1561.
405. Chang, B.D., et al., *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 389-94.
406. Chang, B.D., et al., *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3761-7.
407. Chang, B.D., et al., *Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs*. Oncogene, 1999. **18**(34): p. 4808-18.

408. Schwarze, S.R., et al., *Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(57): p. 8184-92.
409. Galanos, P., et al., *Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing*. *Nature Cell Biology*, 2016. **18**(7): p. 777-789.
410. Liao, C., Y. Xiao, and L. Liu, *The Dynamic Process and Its Dual Effects on Tumors of Therapy-Induced Senescence*. *Cancer Manag Res*, 2020. **12**: p. 13553-13566.
411. Sagiv, A., et al., *NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells*. *Aging (Albany NY)*, 2016. **8**(2): p. 328-44.
412. Li, H., et al., *Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(19): p. 3346-3358.
413. Xue, W., et al., *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas*. *Nature*, 2007. **445**(7128): p. 656-660.
414. Soriani, A., et al., *ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype*. *Blood*, 2009. **113**(15): p. 3503-11.
415. Kale, A., et al., *Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells*. *Immunity & Ageing*, 2020. **17**(1): p. 16.
416. Milanovic, M., et al., *Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness*. *Nature*, 2018. **553**(7686): p. 96-100.
417. Walcher, L., et al., *Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1280.
418. Ruhland, M.K., et al., *Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11762.
419. Muñoz, D.P., et al., *Targetable mechanisms driving immunoevasion of persistent senescent cells link chemotherapy-resistant cancer to aging*. *JCI Insight*, 2019. **5**(14).
420. Yu, X., et al., *Radiation-promoted CDC6 protein stability contributes to radioresistance by regulating senescence and epithelial to mesenchymal transition*. *Oncogene*, 2019. **38**(4): p. 549-563.
421. Coppé, J.P., et al., *Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(40): p. 29568-74.
422. Achuthan, S., et al., *Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(43): p. 37813-29.
423. Ritschka, B., et al., *The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration*. *Genes Dev*, 2017. **31**(2): p. 172-183.
424. Laberge, R.M., et al., *MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(8): p. 1049-61.
425. Orjalo, A.V., et al., *Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(40): p. 17031-6.
426. Myrianthopoulos, V., et al., *Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019. **193**: p. 31-49.
427. Robbins, P.D., et al., *Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021. **61**: p. 779-803.
428. Zoico, E., et al., *Senolytic effects of quercetin in an in vitro model of pre-adipocytes and adipocytes induced senescence*. *Scientific Reports*, 2021. **11**(1): p. 23237.
429. Saccon, T.D., et al., *Senolytic Combination of Dasatinib and Quercetin Alleviates Intestinal Senescence and Inflammation and Modulates the Gut Microbiome in Aged Mice*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2021. **76**(11): p. 1895-1905.
430. Zhu, Y., et al., *Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors*. *Aging Cell*, 2016. **15**(3): p. 428-35.

431. Amor, C., et al., *Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies*. *Nature*, 2020. **583**(7814): p. 127-132.
432. Sevilla-Movilla, S., et al., *Upregulated expression and function of the  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin in multiple myeloma cells resistant to bortezomib*. *J Pathol*, 2020. **252**(1): p. 29-40.
433. Denman, C.J., et al., *Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30264.
434. Tey, S.K., et al., *Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allogeneic T cells after haploidentical stem cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. **13**(8): p. 913-24.
435. Cosset, F.L., et al., *High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum*. *J Virol*, 1995. **69**(12): p. 7430-6.
436. Franke, N.E., et al., *Impaired bortezomib binding to mutant  $\beta$ 5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells*. *Leukemia*, 2012. **26**(4): p. 757-68.
437. Rajagopalan, S. and E.O. Long, *Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(50): p. 20596-601.
438. Ghermezi, M., et al., *Serum B-cell maturation antigen: a novel biomarker to predict outcomes for multiple myeloma patients*. *Haematologica*, 2017. **102**(4): p. 785-795.
439. Perez-Amill, L., et al., *Preclinical development of a humanized chimeric antigen receptor against B cell maturation antigen for multiple myeloma*. *Haematologica*, 2021. **106**(1): p. 173-184.
440. Jones, R.G., et al., *CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly*. *J Exp Med*, 2002. **196**(3): p. 335-48.
441. Kim, J.Y., et al., *Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation*. *Exp Mol Med*, 2006. **38**(5): p. 474-84.
442. Liu, Q., et al., *Irradiated chimeric antigen receptor engineered NK-92MI cells show effective cytotoxicity against CD19(+) malignancy in a mouse model*. *Cytotherapy*, 2020. **22**(10): p. 552-562.
443. Klingemann, H., *The NK-92 cell line-30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer*. *Cytotherapy*, 2023.
444. Romanski, A., et al., *CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies*. *J Cell Mol Med*, 2016. **20**(7): p. 1287-94.
445. 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*, 2018. **29**(5): p. 585-601.
446. Luanpitpong, S., et al., *Selective Cytotoxicity of Single and Dual Anti-CD19 and Anti-CD138 Chimeric Antigen Receptor-Natural Killer Cells against Hematologic Malignancies*. *J Immunol Res*, 2021. **2021**: p. 5562630.
447. 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*, 2019. **12**(1): p. 49.
448. Jinushi, M., et al., *Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas*. *J Hepatol*, 2005. **43**(6): p. 1013-20.
449. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. *Nature*, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
450. Shah, N., et al., *B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches*. *Leukemia*, 2020. **34**(4): p. 985-1005.

451. Seipel, K., et al., *sBCMA Plasma Level Dynamics and Anti-BCMA CAR-T-Cell Treatment in Relapsed Multiple Myeloma*. *Curr Issues Mol Biol*, 2022. **44**(4): p. 1463-1471.
452. Navarrete-Galvan, L., et al., *Optimizing NK-92 serial killers: gamma irradiation, CD95/Fas-ligation, and NK or LAK attack limit cytotoxic efficacy*. *J Transl Med*, 2022. **20**(1): p. 151.
453. Zhang, C., et al., *ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2015. **108**(5).
454. You, F., et al., *A novel CD7 chimeric antigen receptor-modified NK-92MI cell line targeting T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Am J Cancer Res*, 2019. **9**(1): p. 64-78.
455. Chen, K.H., et al., *Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor*. *Leukemia*, 2017. **31**(10): p. 2151-2160.
456. Zhu, L., et al., *Natural Killer Cell (NK-92MI)-Based Therapy for Pulmonary Metastasis of Anaplastic Thyroid Cancer in a Nude Mouse Model*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 816.
457. Williams, B.A., et al., *CD16(+)NK-92 and anti-CD123 monoclonal antibody prolongs survival in primary human acute myeloid leukemia xenografted mice*. *Haematologica*, 2018. **103**(10): p. 1720-1729.
458. Zhang, Q., et al., *Synergistic Effects of Cabozantinib and EGFR-Specific CAR-NK-92 Cells in Renal Cell Carcinoma*. *J Immunol Res*, 2017. **2017**: p. 6915912.
459. Seidel, D., et al., *Disialoganglioside-specific human natural killer cells are effective against drug-resistant neuroblastoma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2015. **64**(5): p. 621-34.
460. 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*, 2015. **5**: p. 11483.
461. Bergman, H., E. Hermanson, and C. Lindqvist, *Establishment of Cytotoxic and Non-cytotoxic NK-92 Cell Clones - Evaluation of Their Function as Target Cells*. *Anticancer Res*, 2022. **42**(9): p. 4259-4264.
462. Oelsner, S., et al., *Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth*. 2019. **145**(7): p. 1935-1945.
463. Schmidt, P., M.J. Raftery, and G. Pecher, *Engineering NK Cells for CAR Therapy-Recent Advances in Gene Transfer Methodology*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 611163.
464. Verhoeven, E. and F.-L. Cosset, *Surface-engineering of lentiviral vectors*. 2004. **6**(S1): p. S83-S94.
465. Colamartino, A.B.L., et al., *Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2873.
466. Wang, Y., et al., *High expression of NKG2A/CD94 and low expression of granzyme B are associated with reduced cord blood NK cell activity*. *Cell Mol Immunol*, 2007. **4**(5): p. 377-82.
467. Cerwenka, A., J.L. Baron, and L.L. Lanier, *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 11521-6.
468. Diefenbach, A., et al., *Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity*. *Nature*, 2001. **413**(6852): p. 165-71.
469. Guerra, N., et al., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 571-80.
470. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
471. Groh, V., et al., *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(12): p. 6879-84.

472. Pende, D., et al., *Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1076-86.
473. Haertle, L., et al., *Single-Nucleotide Variants and Epimutations Induce Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma*. Clin Cancer Res, 2023. **29**(1): p. 279-288.
474. Rodriguez, C., et al., *Dose Escalation and Expansion of Abbv-383 in Combination with Anti-Cancer Regimens in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. Blood, 2022. **140**(Supplement 1): p. 7326-7327.
475. Zingoni, A., et al., *Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells*. J Immunol, 2015. **195**(2): p. 736-48.
476. Wang, L., et al., *Bortezomib induces cellular senescence in A549 lung cancer cells by stimulating telomere shortening*. 2022. **41**: p. 09603271221124094.
477. Zhao, L., et al., *Sirtuins and their Biological Relevance in Aging and Age-Related Diseases*. Aging Dis, 2020. **11**(4): p. 927-945.
478. Zhang, T., A. Barber, and C.L. Sentman, *Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5927-33.
479. Hideshima, T., et al., *Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells*. Blood, 2009. **114**(5): p. 1046-52.
480. Kamstrup, M.R., et al., *Notch1 as a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma*. Blood, 2010. **116**(14): p. 2504-12.
481. Shin, H.M., et al., *NOTCH1 Can Initiate NF- $\kappa$ B Activation via Cytosolic Interactions with Components of the T Cell Signalosome*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 249.
482. Zhang, H., C.M. Weyand, and J.J. Goronzy, *Hallmarks of the aging T-cell system*. 2021. **288**(24): p. 7123-7142.
483. Hjertner, O., et al., *Expression of urokinase plasminogen activator and the urokinase plasminogen activator receptor in myeloma cells*. Br J Haematol, 2000. **109**(4): p. 815-22.
484. Shen, J., et al., *Analysis of soluble urokinase plasminogen activator receptor in multiple myeloma for predicting prognosis*. Oncol Lett, 2015. **10**(4): p. 2403-2409.





## **9. ABREVIATURAS**



**41BB-L:** ligando de 41BB

## A

**ADAM:** “a disintegrin and a metalloproteinase”

**ADCC:** citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AEMPS:** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

**APRIL:** “a proliferation-inducing ligand”

**ARN:** ácido ribonucleico

## B

**BaEV:** envuelta Baboon

**BAFF:** factor de activación de células B

**BCMA:** antígeno de maduración de células B

**BCR:** receptor de células B

**BiKE:** anticuerpo bi-específico para células NK

**BiTE:** anticuerpos biespecíficos de células T

**BLI:** análisis por imagen de bioluminiscencia

**BMSC:** células estromales de la médula ósea

**BSA:** albúmina de suero bovino

**BTZ:** bortezomib

## C

**CAR:** receptor quimérico de antígeno

**CB:** cordón umbilical

**CB-NK:** células NK de sangre de cordón umbilical

**CMF:** citometría de flujo

**CP:** células plasmáticas

**CRAB:** *hypercalcemia, renal failure, anemia and bone lesions*

**CRS:** tormenta de citoquinas

**CTLA-4:** receptor inhibitorio antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos

## D

**D:E:** diana:efector

**DDR:** respuesta a daño en el ADN

## E

**E2F:** factor E2

**EICH:** enfermedad de injerto contra huésped

## F

**FBS:** suero fetal bovino

**FcRL5:** *Fc receptor-like 5*

**FDA:** Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos

**FISH:** *fluorescence in situ hybridization*

**FLC:** cadenas ligeras libres

**FMO:** *fluorescence minus one*

## G

**GFP:** proteína verde fluorescente

**GM-CSF:** factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**GMSI:** gammapatía monoclonal de significado incierto

**GSI:** inhibidor de gamma secretasas

**GSK3:** quinasa glicógeno sintasa 3

## H

**H12O:** hospital 12 de octubre

**HDAC:** histonas deacetilasas

**HLA:** sistema antígeno leucocitario humano

**HP1 $\gamma$ :** *heterochromatin protein 1  $\gamma$*

**HR:** recombinación homóloga

**HRP:** *Horseradish Peroxidase*

## I

**i.p.:** intraperitoneal

**i.v.:** intravenoso

**ICANS:** neurotoxicidad asociada a células inmunes

**iCasp9:** caspasa 9 inducible

**IDO:** indoleamina 2,3-dioxigenasa

**IFN- $\gamma$ :** interferón- $\gamma$

**Ig:** inmunoglobulina

**IgH:** inmunoglobulina de cadena pesada

**IgL:** inmunoglobulina de cadena ligera

**iHDAC:** inhibidores de histona deacetilasas

**IL:** interleuquina

**IMiD:** fármaco inmunomodulador

**IP:** inhibidores del proteasoma

**IPC:** inhibidores de puntos de control

**iPSCs:** células madre inducidas pluripotentes

**ISS:** Sistema de Estadaje Internacional

**ITAM:** motivo activador inmunorreceptor basado en tirosina

**ITIM:** motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina

## J

**JNK:** quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal

## K

**KIR:** “killer cell immunoglobuline-like receptor”

## L

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LDL-R:** receptor de LDL (*low-density lipoprotein*)

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**LV:** vectores lentivirales

## M

**MDSCs:** células supresoras derivadas mieloides

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad

**MM/RR:** mieloma múltiple refractario y en recaída

**MM:** mieloma múltiple

**MMP:** metaloproteinasas de la matriz

**MMQ:** mieloma múltiple quiescente o asintomático

**MO:** médula ósea

**MOI:** multiplicidad de infección

## N

**NAD:** nicotinamida adenina dinucleótido

**NHEJ:** reparación de extremos no homólogos

**NICD:** dominio intracelular de Notch

**NKG2D-L:** ligandos de NKG2D

## P

**P/S:** penicilina/estreptomicina

**PBMC:** células mononucleadas de sangre periférica

**PBS:** solución salina tamponada

**PET:** tomografía por emisión de positrones

**p-H2AX:** H2AX fosforilado

**p-HP1 $\gamma$ :** HP1 $\gamma$  fosforilada

## R

**RANK:** receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B.

**RANKL:** ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B.

**RE:** retículo endoplasmático

**R-ISS:** Sistema de Estadíaaje Internacional revisado

**RMN:** resonancia magnética nuclear

## S

**SEM:** error estándar de la media

**SAHF:** focos de heterocromatina asociados a senescencia

**SASP:** fenotipo secretor asociado a senescencia

**sBCMA:** BCMA soluble

**scFv:** fragmento variable de cadena simple

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

**SG:** supervivencia global

**SLAM:** molécula activadora señalizadora de linfocitos

**SLP:** supervivencia libre de progresión

**sMICA:** MICA soluble

**SP:** sangre periférica

**SP-NK:** células NK de sangre periférica

**SSO:** “sequence specific oligonucleotide”

**STR:** análisis de repeticiones cortas en tándem del ADN

## T

**TACI:** “transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor”

**TAPH:** trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

**TBS:** solución salina tamponada con Tris

**TC:** tomografía computarizada

**TCR:** receptor de células T

**TIGIT:** “T-cell Ig and ITIM domains”

**TIS:** senescencia inducida por tratamiento

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral- $\alpha$

**Tregs:** células T reguladoras

## U

**ULBP:** proteínas de unión a la proteína UL16

**uPA:** uroquinasa activadora de plasminógeno

**uPAR:** receptor de la uroquinasa activadora de plasminógeno

## V

**VCN:** número de copias del vector

**VSV-G:** glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular

## W

**WB:** western-blot

