



UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

FACULDADE  
DE  
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MANUEL AUGUSTO DA COSTA PINTO

***Imunoterapia ativadora do sistema imune no tratamento  
do Mieloma Múltiplo***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA CATARINA ISABEL BATISTA GERALDES SANTOS

PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO ANTUNES CRUZ RIBEIRO

ABRIL/2019

# ***Imunoterapia ativadora do sistema imune no tratamento do Mieloma Múltiplo***

MANUEL AUGUSTO DA COSTA PINTO <sup>1</sup>

PROFESSORA DOUTORA CATARINA ISABEL BATISTA GERALDES SANTOS <sup>2,3,4,5</sup>

PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO ANTUNES CRUZ RIBEIRO <sup>2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Medical Student, Faculty of Medicine of University of Coimbra (FMUC), Coimbra, Portugal  
(manuel\_20\_91@hotmail.com)

<sup>2</sup> Laboratory of Oncobiology and Hematology (LOH) and University Clinic of Hematology/Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

<sup>3</sup> Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) - Group of Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO) - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

<sup>4</sup> Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Coimbra, Portugal

<sup>5</sup> Clinical Hematology Department/Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

## Índice

Abreviaturas.....	3
Resumo e Palavras-chave.....	5
<i>Abstract e Keywords</i> .....	6
Introdução.....	7
Métodos.....	9
Resultados.....	10
1. Fisiopatologia do Mieloma Múltiplo.....	10
1.1. Genética.....	10
1.2. Epigenética.....	10
1.3. Microambiente.....	11
2. Tratamento do Mieloma Múltiplo.....	15
2.1. Células CAR T.....	15
2.1.1. Produção e administração.....	17
2.1.2. Ensaios clínicos.....	18
2.1.3. Ensaios pré-clínicos.....	22
2.1.4. Efeitos adversos.....	24
2.2. Vacinas.....	27
2.2.1. Vacinas pépticas.....	27
2.2.2. Vacinas com células dendríticas.....	28
Discussão e Conclusão.....	31
Agradecimentos.....	33
Referências.....	34

## Abreviaturas

AHSCT	Transplantação autóloga de células estaminais hematopoiéticas
APCs	Células apresentadoras de antígenos
APRIL	<i>Proliferation-inducing factor</i>
BAFF	<i>B-cell activation factor of the TNF family</i>
BCMA	Antígeno de maturação das células B
BMSC	<i>Bone marrow stroma cells</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CD44v6	<i>Variant 6 of the CD44 cell-surface protein family</i>
CRAB	<i>Hypercalcemia, Renal dysfunction, Anemia and Bone lesions</i>
CRES	<i>Células CAR T-related encephalopathy syndrome</i>
CRS	<i>Cytokine-release syndrome</i>
CS1	<i>Surface glycoprotein</i>
CXCL12	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HLH	<i>Haemophagocytic lymphohistiocytosis</i>
HSP70	<i>70 kilodalton heat shock proteins</i>
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
Igs	Imunoglobulinas
IL	<i>Interleukin</i>
ITGB1	Integrina $\beta$ 1
ITGB2	Integrina $\beta$ 2
LCAR-B38M	<i>Dual epitope-binding CAR T cell against two distinct BCMA epitopes</i>
MAP	<i>Multiple-antigen peptide</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>

MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MGUS	Gamapatia monoclonal de significado indeterminado
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MIP-1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein 1<math>\alpha</math></i>
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
MUC-1	<i>Mucin 1</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKG2D	<i>Natural killer group 2 member D transmembrane receptor</i>
OPG	Osteoprotegerina
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-1L	<i>Programmed ligand cell death 1</i>
PFS	<i>Progression free survival</i>
PVX	<i>PVX-410 peptide vaccine</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
scFV	<i>Single chain variable fragment</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	<i>T regulatory</i>
TRUCKs	<i>T cells redirected for universal cytokine killing</i>
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
Wnt	<i>Wingless-type</i>

## Resumo

**Introdução:** O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica maligna caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea. Atualmente representa 1% de todos os casos diagnosticados de cancro e tem uma incidência anual de 2,1 novos casos por 100 000 indivíduos, valor que tende a aumentar com o envelhecimento da população. Apesar dos avanços no tratamento do MM, este permanece uma doença incurável em que os doentes nem sempre respondem eficazmente ao tratamento *standard*. A intensa investigação feita na última década para esclarecer a fisiopatologia do MM permitiu o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras que procuram reverter a imunossupressão provocada pelo tumor. Neste trabalho, será feita uma breve revisão da fisiopatologia do MM com vista à apresentação do potencial papel da imunoterapia ativadora do sistema imune, particularmente das células T quiméricas (células CAR T) e das vacinas tumorais.

**Métodos:** Para a escrita desta revisão, foi realizada uma pesquisa na literatura em dezembro de 2018 nas bases de dados *Pubmed* e *ISI Web Of Science*, usando a terminologia MeSH ou equivalente. Os resultados foram filtrados para a língua inglesa e para publicações realizadas nos últimos dez anos, sendo excluídos os *case reports*.

**Resultados:** O MM resulta da acumulação de várias alterações moleculares nos plasmócitos e no microambiente, entre as quais mutações genéticas e alterações epigenéticas, que contribuem para o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência à apoptose e às estratégias terapêuticas atuais. Os avanços no conhecimento do microambiente tumoral permitiram definir novos alvos terapêuticos, mais específicos, e decisivos na progressão da doença. Estes podem ser reconhecidos por células CAR T que, ao serem infundidas, irão conduzir à destruição celular seletiva. Estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado resultados muito interessantes, sendo o BCMA, o CD19, o CD138 e as cadeias leves  $\kappa$  os antígenos tumorais mais testados. No entanto, têm sido descritos efeitos secundários importantes como a síndrome de libertação de citocinas, a síndrome de encefalopatia e a linfocitose hemofagocítica. Os antígenos tumorais podem também ser administrados sob a forma de vacinas pépticas ou com células dendríticas ativadas para que o sistema imunitário readquiria a capacidade de os reconhecer como estranhos. Apesar dos bons resultados em estudos pré-clínicos, os ensaios clínicos com vacinas não revelaram resultados tão promissores.

**Conclusão:** A imunoterapia ativadora do sistema imune constitui uma abordagem promissora no tratamento do MM, tanto pelo uso de vacinas em doentes com risco de progressão para MM como das células CAR T no tratamento da doença refratária ou recidivante. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar o seu benefício efetivo face à terapêutica atual.

**Palavras-chave:** Mieloma múltiplo, Fisiopatologia, Imunoterapia, Células CAR T, Vacinas tumorais.

## **Abstract**

**Introduction:** Multiple myeloma (MM) is a malignant hematologic neoplasia characterized by clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow. Actually, it represents 1% of all diagnosed cases of cancer and it has an annual incidence of 2.1 new cases per 100,000 people and it tends to increase due to the aging of the population. Despite recent advances in the treatment of MM, it remains an incurable disease in which patients not always respond to the standard therapy. Research in the last ten years has focused on clarify MM pathophysiology in order to enable development of innovative therapeutic approaches to revert the tumor induced-immunosuppression. The aim of this review is to highlight some aspects of MM pathophysiology in order to describe the potential role of activating immunotherapy, particularly chimeric T cells (CAR T cells) and cancer vaccines.

**Methods:** In order to write this review, it was performed a literature search during December 2018 in Pubmed and ISI Web Of Science, using MeSH terms or equivalent terminology. Results were narrowed to English language and date of publication in the last ten years and case reports were excluded.

**Results:** MM arises from a sequence of multiple molecular changes in plasma cells and tumor microenvironment, whose accumulation of genetic mutations and epigenetic alterations contributes to the development of different resistance mechanisms to apoptosis and to actual therapeutic strategies. Advances in the understanding of tumor microenvironment have allowed to find more specific therapeutic targets. Recognition of these targets by CAR T cells leads to subsequent selective destruction of tumor cells. Preclinical and clinical studies have reported interesting results, specifically using BCMA, CD19, CD138 and  $\kappa$  light chains as tumor antigens. However, important adverse events have been reported such as cytokine release syndrome, CAR T cells-related encephalopathy syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis. Tumor antigens can also be administered to patients as peptide or activated dendritic cells-containing vaccines in order to re-educate the immune system to recognize them as non-self. Promising results were found in preclinical trials using cancer vaccines. However, their effectiveness was not confirmed in further clinical trials.

**Conclusion:** Activating immunotherapy is a promising approach for the treatment of MM. Both cancer vaccines and CAR T cells have shown potential to treat patients with high risk of progression to MM or with relapse or refractory disease, respectively. However, more studies are needed to prove their effective benefit compared to standard therapy.

**Keywords:** Multiple myeloma, Pathophysiology, Immunotherapy, CAR T cells, cancer vaccines.

## Introdução

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica maligna caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea (MO), tipicamente acompanhada pela secreção monoclonal de imunoglobulinas. Esta doença está frequentemente associada à presença de biomarcadores de malignidade e/ou sinais de lesão de órgão definidos pelos critérios CRAB, especificamente hipercalcemia (C), disfunção renal (R), anemia (A) e lesões ósseas (B). (1) Atualmente, representa cerca de 1% de todos os casos diagnosticados de cancro, tratando-se da segunda doença maligna hematológica mais frequente, com uma incidência anual de 2,1 novos casos por 100 000 indivíduos. (2) Estima-se que este valor tenda a aumentar nos próximos anos, tendo por base sobretudo o envelhecimento e o aumento da população mundial. (3) A idade média de diagnóstico situa-se nos 70 anos, sendo o sexo masculino ligeiramente mais afetado. (3,4)

A história natural da doença decorre num *continuum* que vai desde a gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) até ao MM sintomático, passando por uma fase intermédia de MM indolente. (5) Considera-se que o MGUS é uma condição pré-maligna presente em cerca de 4% dos indivíduos com mais de 50 anos, sendo caracterizada pela deteção de cadeias leves de imunoglobulinas no soro sem doença associada e na ausência de evidência clínica ou laboratorial de distúrbios dos plasmócitos. Apesar de somente 10% dos indivíduos diagnosticados com MM terem antecedentes descritos de MGUS, alguns estudos sugerem que esta condição precede de forma sistemática o MM, com um risco de progressão anual médio de 1%. O mieloma indolente, por sua vez, diz respeito a uma condição intermédia entre o MGUS e o MM, cuja diferença em relação a este último se prende com a ausência de sintomas de amiloidose ou sinais de lesão de órgão. Apresenta um risco anual de progressão para MM de 10% nos primeiros cinco anos, 3% nos cinco anos seguintes e 1% nos dez anos seguintes, perfazendo uma probabilidade cumulativa de 73% aos quinze anos. (4)

A clínica associada ao MM surge na sequência da proliferação dos plasmócitos na MO ou em outros órgãos e por lesão renal devido ao excesso de cadeias leves de imunoglobulinas, sendo predominantes os sintomas de fadiga e dores osteoarticulares. Ao exame físico, o doente poderá apresentar ainda, embora mais raramente, febre, linfadenopatias e hepatoesplenomegalia. (6) Neste contexto clínico, deverá ser solicitado hemograma completo, bioquímica sérica, eletroforese e imunofixação das proteínas séricas e urinárias. Um doente com MM poderá apresentar-se com anemia (ou mesmo pancitopenia, se infiltração maciça da MO), diminuição da contagem de reticulócitos, aumento da velocidade de

sedimentação, hipercalcémia, elevação da creatinina sérica, elevação das proteínas séricas totais, aumento do hiato aniônico por aumento da produção de paraproteínas, elevação da  $\beta$ 2 microglobulina, gamapatia monoclonal com proteína monoclonal e presença de proteína de *Bence Jones* na urina. Para confirmar o diagnóstico, no entanto, é sempre necessário realizar biópsia ou aspirado da MO com análise citológica, imunofenotípica e das alterações citogenéticas por *fluorescence in situ hybridization* (FISH). (7)

De facto, o diagnóstico de MM assenta na presença de pelo menos 10% de um clone de plasmócitos na biópsia da MO ou plasmocitoma extra-medular associada a pelo menos um dos seguintes eventos definidores de mieloma: sinais de lesão de órgão segundo o acrónimo CRAB (hipercalcemia, clearance da creatinina inferior a 40 mL/min ou creatinina sérica superior a 2 mg/dL, anemia, lesões ósseas detetadas por radiografia do esqueleto, tomografia computadorizada ou esta última associada a tomografia de emissão de positrões), e/ou pelo menos 60% de um clone de plasmócitos da MO a nível sérico, razão entre cadeias leves livres séricas envolvidas e não envolvidas de pelo menos 100 (sendo a cadeia envolvida superior ou igual a 100 mg/L), e presença de mais do que uma lesão focal com pelo menos 5 mm detetada por ressonância magnética nuclear. (5)

Pensa-se que o primeiro caso de MM, descrito na década de 40 do século XIX, tenha ocorrido com Sarah Newbury, a quem foram detetadas alterações numa amostra de urina que seriam características da presença de proteínas. (8) No entanto, só na década de 60 do século XX se começou a tratar o MM de uma forma mais eficaz, o que se traduziu por um aumento da sobrevivência até 3 anos, através da associação de melfalano com prednisolona. (9) Posteriormente, em doentes de alto risco, verificou-se que o aumento da dose do melfalano estava associado a maior taxa de resposta ao tratamento, apesar de também ocorrer mielossupressão mais prolongada. Ora, este efeito secundário foi o que veio permitir a realização da transplantação autóloga de progenitores hematopoéticos. (9) Só mais tarde, no início do século XXI, o tratamento do MM sofreu uma grande evolução com a descoberta de novos fármacos com diferentes mecanismos de ação. As novas estratégias terapêuticas, que vão desde o uso de imunomoduladores (como lenalidomida, talidomida e pomalidomida) e inibidores do proteasoma (como bortezomib e carfilzomib) até ao uso de anticorpos monoclonais (como elotuzumab e daratumumab), fizeram com que a sobrevivência a 5 anos dos doentes duplicasse na última década. (10)

Atualmente, o início do tratamento está indicado apenas em doentes com mieloma indolente com alto risco de progressão para MM e em doentes com MM diagnosticado, uma vez que não foi demonstrado benefício em fases mais precoces da doença. (6) Podem-se distinguir,

nos doentes mais jovens e sem comorbilidades significativas, quatro fases na abordagem terapêutica: terapêutica inicial (indução), transplante de células estaminais autólogas (AHSCT), terapia de consolidação/manutenção e, se necessário, tratamento da recidiva. (4) O tratamento inicial tem por objetivo alcançar uma resposta máxima antes de se adotar uma abordagem mais agressiva, como é o caso da AHSCT. Ainda não existe consenso acerca do esquema terapêutico mais adequado, ainda que se tenha verificado um aumento da taxa de remissão da doença usando a associação de um agente imunomodulador com um inibidor do proteasoma e um glucocorticoide. (4) A AHSCT constitui o passo seguinte na abordagem terapêutica, caso o doente apresente um bom estado geral, idade não superior a 70 anos e ausência de comorbilidades. A sua realização está associada a maiores taxas de resposta completa e a aumento da sobrevivência em cerca de 12 meses. (4) A quimioterapia pós-transplante está indicada por um período limitado, com vista à diminuição da carga tumoral e consequente consolidação do tratamento.

No entanto, caso a doença progrida rapidamente ainda sob a terapia inicial ou não responda às linhas de tratamento subsequentes já estabelecidas, restam poucas opções terapêuticas com reconhecida eficácia e efeitos secundários toleráveis. (1) A intensa investigação feita na última década para esclarecer a fisiopatologia da doença permitiu o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras que procuram reverter a imunossupressão provocada pelo MM. Neste trabalho, fez-se uma breve revisão da fisiopatologia do MM com vista à apresentação do potencial papel da imunoterapia ativadora do sistema imune, particularmente das células T quiméricas cujo recetor foi alterado para reconhecer especificamente e atuar perante as células tumorais e das vacinas que estimulam ou introduzem células apresentadoras de antígenos previamente ativadas contra o MM.

## **Métodos**

Em dezembro de 2018, foi feita uma pesquisa na base de dados do *PubMed*, com os seguintes termos *MESH* - “*Multiple Myeloma/physiopathology*”, “*Multiple Myeloma/therapy*”, “*Receptors, Antigen, T-Cell*” e “*Cancer Vaccines*” -, e no *ISI Web Of Science*, usando terminologia de pesquisa equivalente. Os resultados foram filtrados para língua inglesa e para publicações realizadas nos últimos dez anos, sendo excluídos os *case reports*. Foram encontrados 253 artigos, dos quais 145 foram excluídos porque não iam ao encontro dos objetivos principais deste trabalho ou continham informação duplicada. Após avaliação dos artigos restantes, 59 foram ilegíveis para inclusão nesta revisão. Outros considerados relevantes para os objetivos foram também incluídos.

## Resultados

### 1. Fisiopatologia do Mieloma Múltiplo

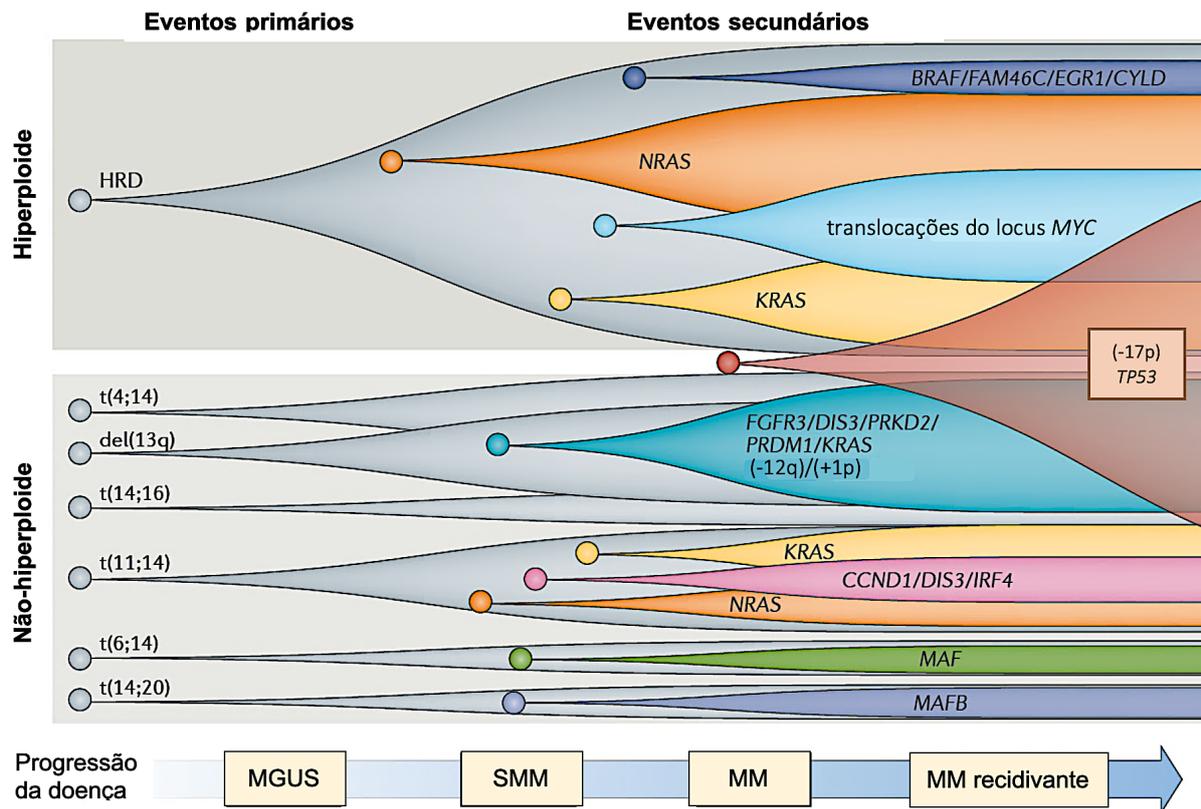
O mieloma múltiplo (MM) surge na sequência de múltiplas alterações dos plasmócitos, tanto a nível genético, como epigenético ou do microambiente, que culminam numa proliferação celular descontrolada. Inicialmente, esta proliferação celular é pré-maligna e não se faz acompanhar de manifestações clínicas, no entanto, pode ocorrer progressão para mieloma indolente e MM.

#### 1.1. Genética

As mutações genéticas podem ocorrer logo ao nível das células germinativas, aumentando assim a suscetibilidade global para o desenvolvimento do MM. Os eventos genéticos iniciais, designados primários, podem ser detetados no MGUS e ser divididos em hiperplóides (50% dos casos) e não hiperdiplóides (**Fig. 1**). (11) Nos primeiros, o aparecimento do tumor é caracterizado pela presença de trissomias de diferentes cromossomas, por exemplo, dos cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21. Nos segundos, os tumores são caracterizados por translocações nos genes que codificam as cadeias pesadas das imunoglobulinas, sendo as t(11;14) e t(4;14) as mais frequentes. (12, 13) Uma série de eventos secundários posteriores poderão ocorrer, facilitando a proliferação de um clone de células específico. Estes eventos podem ser, por exemplo, translocações envolvendo o gene MYC, *copy-number variations*, bem como mutações somáticas que afetem as vias de sinalização MAPK1, NF- $\kappa$ B e de reparação do DNA. Como estas mutações podem sobrepor-se ao longo do tempo, no final teremos a proliferação de diferentes clones de células com diferentes mecanismos de resistência associados. Em média, cada doente com MM tem 5 linhagens celulares diferentes, tornando mais difícil prever a resposta a um determinado tratamento. (11)

#### 1.2. Epigenética

Diversos estudos têm demonstrado que as alterações epigenéticas moduladoras da expressão dos genes têm também um papel importante. De facto, verificou-se que vários genes supressores tumorais se encontram hipermetilados na fase inicial do MM, o que está associado a maior progressão do tumor. Do mesmo modo, alterações no perfil de metilação e acetilação das histonas ou a existência de microRNAs que interfiram na transcrição dos genes reguladores do ciclo celular estão comprovadamente associados a resistência aumentada à apoptose. (14, 15)



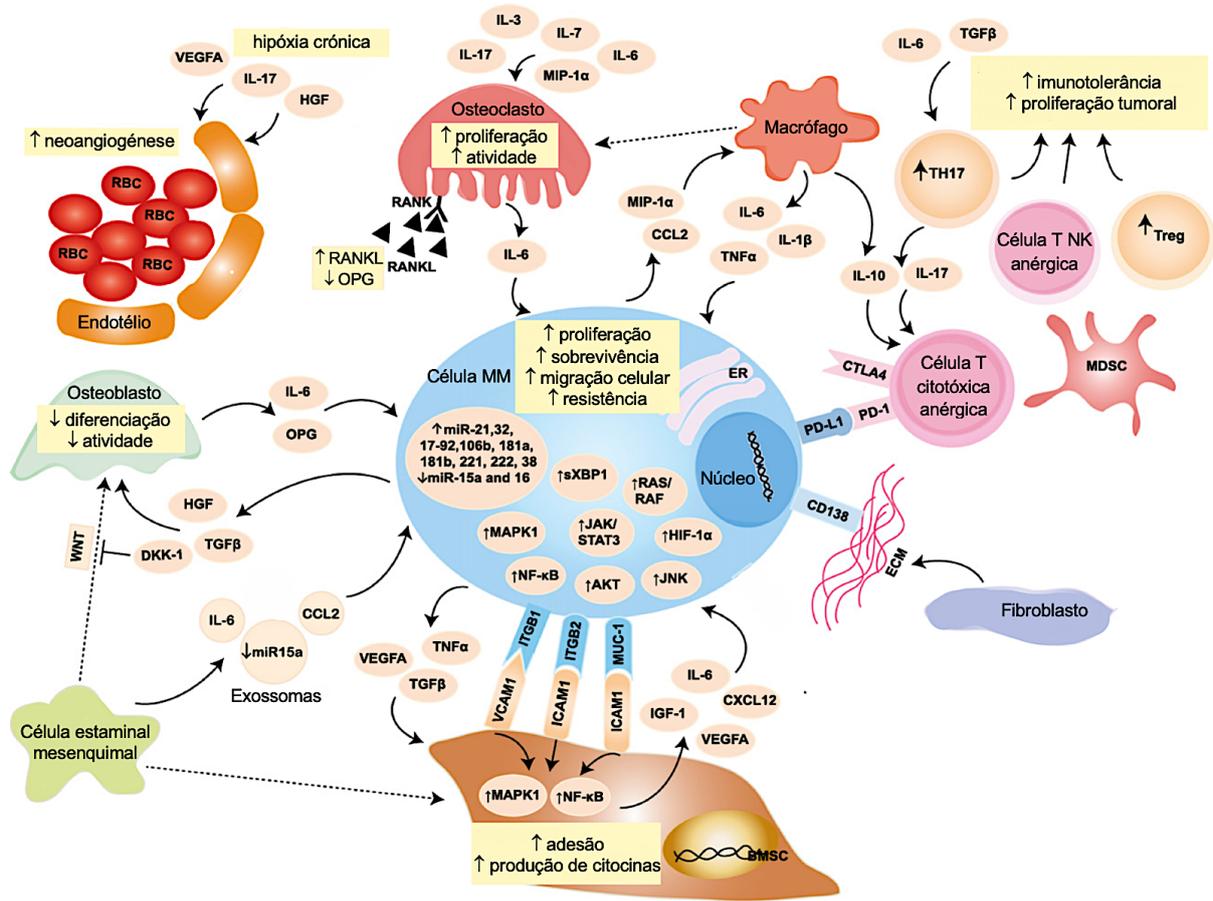
**Figura 1 – Modelo de evolução dos diferentes clones celulares no Mieloma Múltiplo.** Estão representadas na imagem as mutações mais frequentemente associadas à evolução da gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) para mieloma múltiplo (MM). Os clones celulares estão representados com círculos, os eventos genômicos primários com cor cinzenta, tanto em tumores hiperdiploides (HRD) como não hiperplóides, e os eventos genômicos secundários com diferentes cores. del, deleção; SMM, mieloma múltiplo indolente; t, translocação. (Adaptado de Manier *et al.*, 2017)

### 1.3. Microambiente

O microambiente tumoral favorece a interação entre as células estromais da medula óssea (BMSCs) e as células do MM através de moléculas de adesão celular vascular (VCAM1) e intercelular 1 (ICAM1), integrinas  $\beta 1$  (ITGB1) e  $\beta 2$  (ITGB2), e células de superfície de mucina 1 (MUC-1) (**Fig. 2**). Consequentemente ocorre ativação das vias MAPK1 e NF- $\kappa$ B, esta última apenas nas células estromais, com libertação de IL-6, CXCL12, IGF-1 e VEGFA, estimulando a mielomagénese. (16)

As células estaminais mesenquimais têm a capacidade de autorregeneração e podem diferenciar-se em fibroblastos, adipócitos, condrócitos ou osteoblastos. Além disso, apresentam também a capacidade de secretar VEGFA, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF, favorecendo a proliferação de células malignas e inibindo os osteoblastos. (17) Há uma comunicação direta

entre as células estaminais mesenquimais e as células do MM através de exossomas contendo fatores oncogênicos (IL-6, CCL2, fibronectina) e concentrações variáveis de microRNAs (o miRNA 15a, por exemplo, é um supressor tumoral transferido em baixas concentrações). (15,18)



**Figura 2 – Contribuição do microambiente da medula óssea para o desenvolvimento do Mieloma Múltiplo.** As células do mieloma múltiplo (MM) interagem com componentes celulares e acelulares da medula óssea, incluindo diversas citocinas e quimiocinas. As setas a tracejado correspondem a diferenciação celular e as setas preenchidas indicam a liberação e/ou efeito na célula alvo. BMSC, célula estromal da medula óssea; CCL2, *chemokine (C-C motif) ligand 2*; CTLA4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; CXCL12, *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*; CXCR4, *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*; DKK1, *Dickkopf-related protein 1*; ER, retículo endoplasmático; HIF-1 $\alpha$ , *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ; HGF, fator de crescimento do hepatócito; ICAM1, *intercellular adhesion molecule 1*; IGF-1, *insulin-like growth factor 1*; ITGB1, integrina  $\beta$ 1; ITGB2, integrina  $\beta$ 2; JNK, *c-JUN N-terminal kinase*; MAPK1, *mitogen-activated protein kinase 1*; MDSC, *myeloid-derived suppressor cell*; MIP-1 $\alpha$ , *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ; MUC-1, mucina 1; NK, *natural killer*; OPG, osteoprotegerina; PD-1, *programmed cell death 1*; PD-L1, *programmed ligand death 1*; RANK, *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; RANKL, *RANK ligand*; RBC, eritrócito; TGF- $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* ; TH17, *T helper 17 cell*; Treg, *regulatory T cell*; VCAM1, *vascular cell adhesion molecule 1*; VEGFA, *vascular endothelial growth factor A*; WNT, *wingless-type*. (Adaptado de Bianchi & Anderson, 2015)

Fisiologicamente, há um equilíbrio entre os osteoblastos e os osteoclastos que garante uma densidade óssea adequada, cuja regulação é feita através da hormona paratiroideia, glucocorticoides e estrogénios, e ainda por fatores parácrinos, como o TGF $\beta$ . (19) Nos doentes com MM, os osteoblastos encontram-se diminuídos e há uma proliferação excessiva de osteoclastos, favorecendo o aparecimento de lesões líticas, osteopenia e fraturas patológicas. Pensa-se que as células malignas conseguem diminuir a expressão do fator de transcrição RUNX2 nas células mesenquimais e nas células progenitoras de osteoblastos através do aumento da concentração de inibidores da via Wnt-DKK1 e da secreção de fatores anti-osteoblastos TGF $\beta$ . (17) Por sua vez, a atividade dos osteoclastos encontra-se aumentada porque existe uma elevação da quantidade de RANKL, diminuição da osteoprotegerina (OPG) e um aumento das citocinas IL-3, IL-6, IL-7 e MIP-1 $\alpha$ . (20)

Uma das características principais do MM é a estimulação da angiogénese que decorre da hipoxia crónica no microambiente da MO, com aumento da expressão de MIP-1 $\alpha$  e VEGFA. (14) Pensa-se que esta hipoxia facilita a transição epitélio-mesenquima, promovendo o tráfego de células tumorais e o surgimento de metástases. Também o fator de crescimento do hepatócito (HGF) e o *syndecan-1* promovem este fenómeno. (14)

Os fibroblastos, derivados das células mesenquimais, têm um papel estrutural nos tecidos. No entanto, num microambiente maligno existe uma estimulação mútua entre estas células, induzindo uma proliferação celular excessiva. A matriz extracelular também está alterada, tendo-se verificado um aumento das integrinas  $\alpha 5\beta 5$ , periostina, metaloproteinase 2, laminina  $\alpha 4$ , recetor  $\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas, inibidor do ativador do plasminogénio tipo 1, entre outros. (14) A leptina, produzida pelos adipócitos, está de igual modo envolvida na proliferação, sobrevivência e migração das células malignas. (21)

Em relação ao sistema imune, pensa-se que o perfil de linfócitos presentes no microambiente do MM é bem diferente quando comparado com indivíduos saudáveis. Concentrações anormalmente elevadas de IL-6 e TGF $\beta$  levam ao aumento de linfócitos Th17 na MO dos doentes. (22) Estas células secretam, entre outras citocinas, IL-10 e IL-17 (fator pró-osteoclastogénico), permitindo a supressão da vigilância do sistema imune e facilitando o surgimento de doença óssea. (23)

As células T citotóxicas do MM, por sua vez, apresentam expressão aumentada do PD-1, um recetor com funções inibitórias, cujo ligando (PD-1L) é expresso à superfície das células tumorais. (14) As células T reguladoras (Treg) têm função imunossupressora nas células T

CD8<sup>+</sup> e nas células apresentadoras de antígenos (APCs), libertando assim IL-10 e TGFβ. Os doentes que apresentem células Treg hiperfuncionantes no sangue periférico apresentam prognóstico desfavorável. (24) No entanto, todas as células T modificam o seu padrão de produção de citocinas, aumentando o RANKL e diminuindo a secreção de interferão γ (IFNγ), favorecendo a proliferação e a ativação dos osteoclastos. (14)

As células NK, por sua vez, representam um grupo heterogéneo de linfócitos com capacidade citotóxica antitumoral e várias propriedades imunorreguladoras. Embora estejam aumentadas no sangue periférico e na MO do doente, a menor expressão do recetor ativador NKG2D e o aumento do PD-1 permite que as células de MM consigam escapar mais facilmente à imunovigilância. (24)

As células supressoras derivadas da linha mieloide (MDSCs) representam uma população de células mieloides imaturas que surge devido ao estado inflamatório crónico a nível do microambiente tumoral. Pensa-se que estas células conseguem inibir a proliferação dos linfócitos, pelo aumento do óxido nítrico e pela secreção de IL-10, estimulando a proliferação dos osteoclastos através do RANKL. Para além disso, as MDSCs são capazes de se diferenciar em macrófagos, levando à produção adicional de IL-6, IL-10 e TNF-α. (24)

## **2. Tratamento do Mieloma Múltiplo**

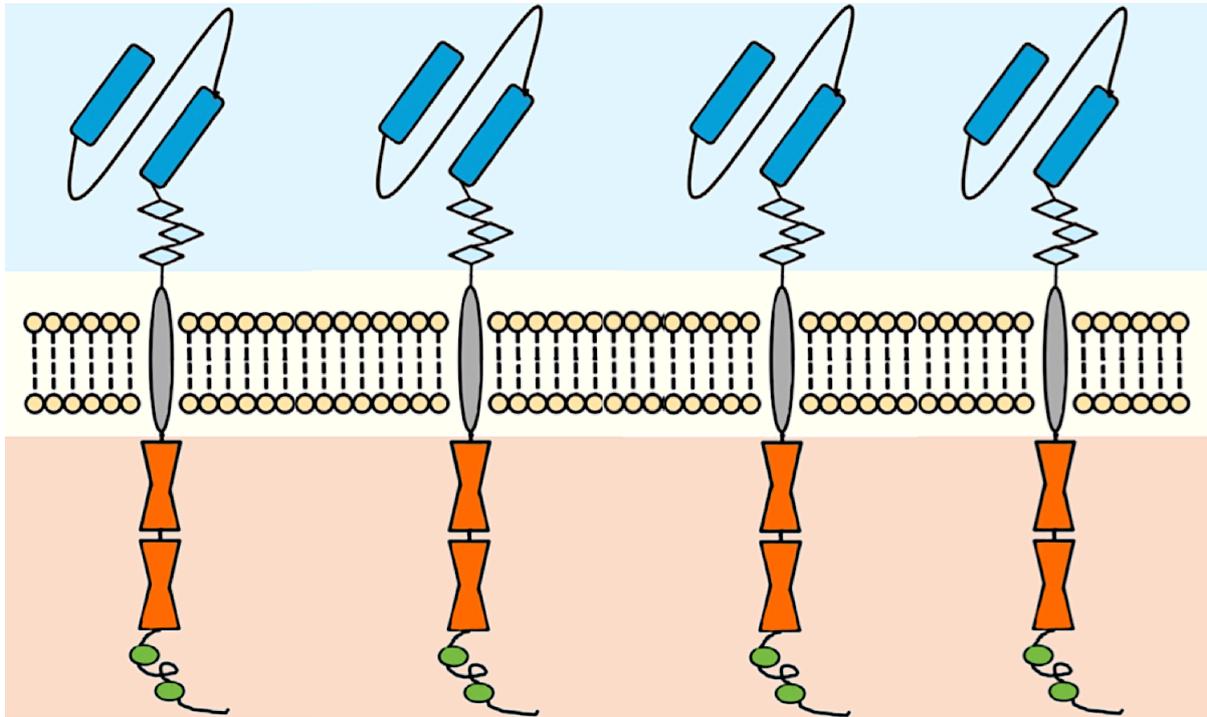
Como o MM é um tumor que cursa com uma supressão global do sistema imune, há uma diminuição da capacidade de vigilância e conseqüente progressão das células tumorais. Apesar dos importantes avanços terapêuticos ocorridos no início do século XXI, com a descoberta dos imunomoduladores (talidomida, lenalidomida e polalidomida) e dos inibidores do proteasoma (bortezomib e carfilzomib), ainda não foi possível encontrar a cura para o MM. (10) Deste modo, e devido à intensa investigação feita na última década com o intuito de melhor esclarecer a fisiopatologia da doença, têm surgido novas e variadas abordagens que prometem reverter a imunossupressão provocada pelo MM. As principais estratégias de imunoterapia propostas podem ser divididas em três grupos: agentes adjuvantes que revertem a imunodepressão mediada pelo tumor; agentes imunologicamente passivos que direcionam a resposta imune para alvos específicos nas células tumorais; e agentes imunologicamente ativos que estimulam o sistema imune especificamente contra as células tumorais. (10) Esta última abordagem constitui um foco preferencial de investigação nos últimos anos, tendo sido criadas duas vias de atuação: a administração de células T quiméricas cujo recetor foi alterado para reconhecer especificamente e atuar perante as células tumorais (células CAR T), e a administração de vacinas que estimulem ou introduzam APCs previamente ativadas contra células tumorais do MM.

### **2.1. Células CAR T**

No início dos anos 90, foi descrita pela primeira vez a manipulação genética de células T, de modo a expressarem recetores quiméricos que reconheçam antígenos específicos. (25) No entanto, só na última década é que a utilização destas células T manipuladas foi vista como uma opção terapêutica revolucionária contra o cancro, com particular impacto no tratamento das doenças hematológicas malignas, das quais o MM é um exemplo. Uma vez identificados antígenos específicos das células tumorais, estes são incorporados nos recetores das células T, o que, associado à adição de domínios coestimulatórios, permite uma resposta imunológica mais específica e efetiva contra o tumor. (26) Esta abordagem permite a utilização e o reconhecimento de um leque mais alargado de antígenos, que não sejam dependentes do complexo major de histocompatibilidade (MHC). (27)

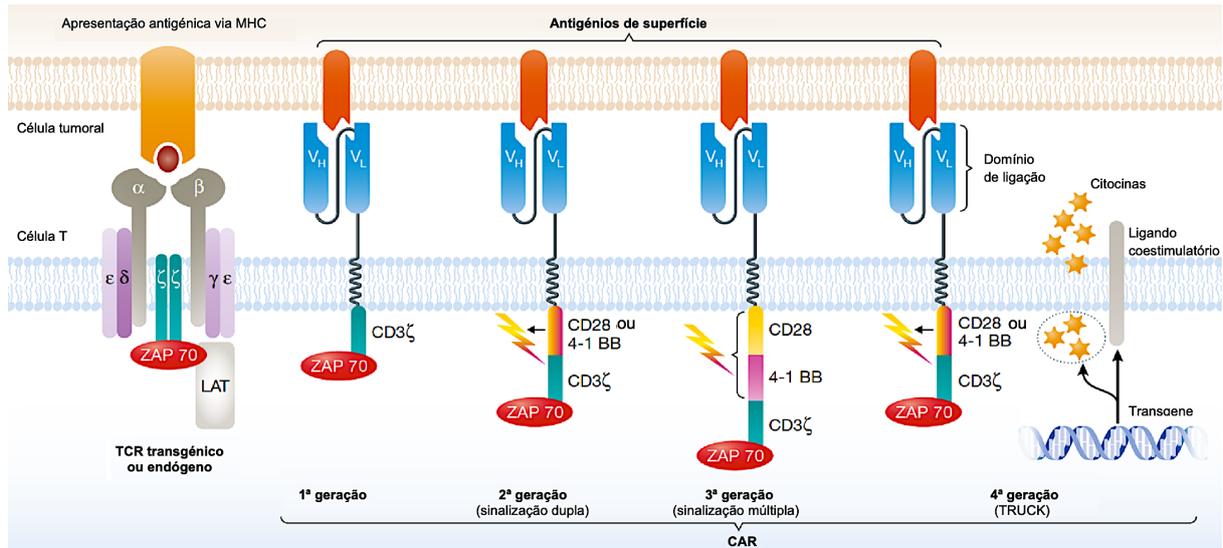
As células CAR T apresentam três componentes estruturais básicos: um domínio extracelular, composto por um local de reconhecimento do antígeno da célula tumoral (um fragmento de cadeia única variável (scFv) de uma imunoglobulina de murino ou humanizado) e uma região de ligação; um domínio transmembranar; e um domínio intracelular, composto por um ou

mais domínios coestimulatórios e um domínio de sinalização principal (geralmente uma cadeia CD3 $\zeta$ ) (**Fig. 3**). (28)



**Figura 3** – Estrutura básica das células CAR T. A azul, um domínio extracelular composto por um local de reconhecimento do antígeno tumoral e uma região de ligação; a amarelo, um domínio transmembranar; a laranja, um domínio intracelular composto por domínios coestimulatórios e um domínio de sinalização principal.

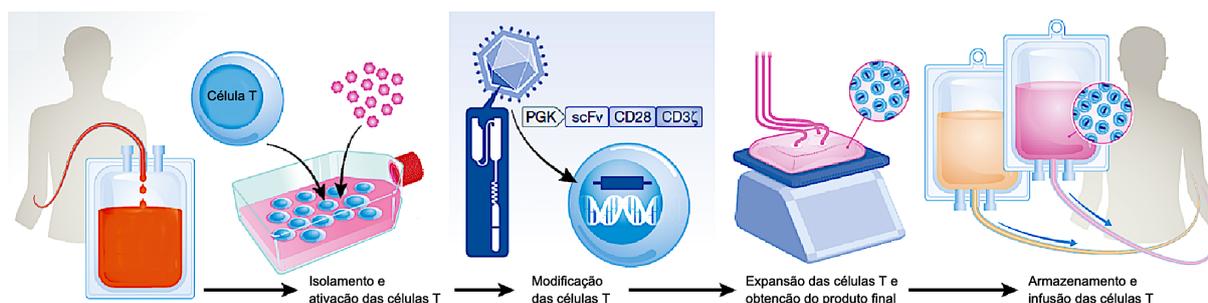
A primeira geração de células CAR T tinha um único domínio de sinalização. Apesar de apresentar resultados promissores em estudos com linhas celulares, uma resposta imunitária não suficientemente efetiva em estudos pré-clínicos motivou o desenvolvimento das células CAR T de segunda geração. (29) Assim, a adição de um ou dois domínios coestimulatórios (dos quais são exemplos o CD28 e/ou 4-1BB CD137) deu origem às células CAR T de segunda e terceira geração, respectivamente. Estas novas gerações permitiram obter melhores resultados *in vivo* ao nível da proliferação celular, libertação de citocinas e resistência à apoptose. (26, 30-33) Mais recentemente, surgiu a quarta geração de células CAR T, também conhecidas por *T cells redirected for universal cytokine killing* (TRUCKs). Estas células têm a mesma estrutura-base das células CAR T de segunda geração, mas com fatores adicionais que melhoram a atividade antitumoral, tais como citocinas, ligandos coestimulatórios ou mesmo enzimas que degradem a matriz extracelular dos tumores (**Fig.4**). (26)



**Figura 4** – Representação esquemática de um recetor de células T (TCR) e dos quatro tipos de recetores antigénicos quiméricos (CARs) na superfície de uma célula T. VH, cadeia pesada; VL, cadeia leve. (Adaptado de Hartmann *et al.*, 2017)

### 2.1.1. Produção e administração

A aplicação das células CAR T na prática clínica requer vários passos (**Fig. 5**). Inicialmente, é necessário isolar as células mononucleares do sangue periférico do doente através de uma leucaferese. De seguida, as células T são isoladas e sujeitas a um processo de ativação/estimulação com esferas paramagnéticas revestidas de anticorpos monoclonais (anti-CD3 e anti-CD28) ou citocinas (como a IL-2, IL-5 e IL-17). A transdução do gene CAR nas células T isoladas, por sua vez, requer a utilização de um vetor viral (gamarretrovírus ou lentivírus), apesar de estar sob investigação o recurso a métodos não-virais. Uma vez completados estes passos, as células CAR T proliferam num meio de cultura apropriado e são feitos ensaios de controlo de qualidade para testar a sua segurança, pureza e potencial eficácia. Se não forem encontrados entraves a este nível, as células CAR T poderão finalmente ser administradas ao doente, geralmente após quimioterapia linfodepletiva, de modo a facilitar a sua persistência e proliferação *in vivo*. De facto, estão descritos três fatores principais com impacto na persistência e proliferação das células CAR T: o tratamento linfoproliferativo, a quantidade de células CAR T transferidas e a composição final das células CAR T. Se realizado num centro de referência, todo este processo dura cerca de duas semanas (o designado “*vein-to-vein*” time). (34)



**Figura 5** – Passos sequenciais no tratamento com células CAR T. As células T são isoladas a partir do sangue do doente ou doador, ativadas e depois geneticamente alteradas para expressar o construto CAR. Após expansão *ex vivo* das células CAR T, faz-se a formulação do produto final, que posteriormente será infundido no doente. (Adaptado de Hartmann *et al.*, 2017)

## 2.1.2. Ensaios clínicos

### Células CAR T anti-BCMA

As células CAR T que têm como alvo o antígeno de maturação das células B (BCMA) constituem o subtipo mais testado em ensaios clínicos para o MM até à data. O BCMA é um fator de necrose tumoral da superfamília 17. Trata-se de um recetor de superfície amplamente expresso nos estádios finais da maturação das células B, especialmente nos plasmócitos, sendo os seus ligandos o BAFF e o APRIL, cuja expressão é praticamente ausente em células B *naive* e de memória. A sua principal função consiste em manter a homeostasia celular. (35)

Verificou-se que o BCMA é expresso consistentemente nas células de MM, mas também que circula na corrente sanguínea numa forma livre, cuja concentração permite prever indiretamente a resposta terapêutica do doente. Assim, uma maior concentração da forma solúvel do BCMA associa-se a um sistema imune mais deprimido e, conseqüentemente, a piores resultados terapêuticos. (36,37) Aliado ao seu papel na sobrevivência e proliferação celular, o BCMA constitui sem dúvida um alvo terapêutico atrativo contra o MM.

Num estudo realizado *in vivo*, comprovou-se que as células CAR T anti-BCMA de segunda geração (com um domínio CD3ζ acoplado a um domínio coestimulatório CD28 e CAR derivado de anticorpos anti-BCMA de murino) poderiam reconhecer e destruir células do MM e da linha mieloide. (38) Os resultados promissores deste estudo motivaram a realização do primeiro ensaio clínico utilizando como alvo o BCMA, cujos principais objetivos se relacionaram com o reconhecimento do perfil de segurança destas células e da sua atividade

contra o MM. Para isso, foram selecionados 12 doentes que não responderam eficazmente a vários tipos de tratamento e cujos plasmócitos tivessem expressão do BCMA superior a 50%. Foi administrada uma dose diária de ciclofosfamida ( $300\text{mg}/\text{m}^2$ ) e fludarabina ( $30\text{ mg}/\text{m}^2$ ) nos dias -5, -4 e -3 prévios à transferência de uma dose única de células CAR T anti-BCMA (concentrações entre  $0,3 - 9 \times 10^6$  células CAR T/kg). Verificou-se que 3/6 doentes que receberam as doses mais elevadas de células CAR T anti-BCMA apresentaram remissão da doença superior a 8 semanas. Num desses doentes, aliás, não se conseguiram detetar proteínas monoclonais na urina ou no soro, por imunoeletroforese, mesmo após 26 semanas desde a transferência das células CAR T anti-BCMA. (39)

Noutro estudo pré-clínico, os investigadores analisaram as sequências de imunoglobulinas humanas conhecidas, tendo identificado 15 scFVs capazes de se ligar ao BCMA. Após este passo inicial, recorreram ao vetor lentivírus para construir células CAR T de segunda geração que apresentassem um domínio coestimulatório 4-1BB, sendo o scFv anti-BCMA totalmente humano. Através de ensaios *in vitro*, os investigadores conseguiram identificar os scFVs que apresentavam melhor capacidade de ligação ao BCMA e desencadeavam maior atividade citolítica e produção de citocinas. Com estudos *in vivo*, por sua vez, determinaram qual dos clones de células apresentava atividade citolítica mais consistente e duradoura. (40) Foi iniciado então um ensaio clínico de fase 1 com o clone de células CAR T promissor, cujos resultados preliminares sobre segurança, eficácia e impacto da linfodepleção foram apresentados na reunião Anual da Sociedade Americana de Hematologia (ASH) de 2017. Neste ensaio, foram selecionados 24 doentes, com resposta ineficaz a várias linhas de tratamento prévias, e divididos em três grupos, independentemente dos seus níveis de expressão do BCMA. A administração das células CAR T foi feita em três doses ao longo de três dias (10% no dia zero, 30% no dia um e 60% no dia dois), perfazendo um total de  $1-5 \times 10^8$  células (sem linfodepleção) no grupo um,  $1-5 \times 10^7$  células (prévia linfodepleção com  $1,5\text{ g}/\text{m}^2$  de ciclofosfamida) no grupo dois e  $1-5 \times 10^8$  células (prévia linfodepleção com  $1,5\text{ g}/\text{m}^2$  de ciclofosfamida) no grupo três. A resposta ao tratamento teve uma duração média de 4 meses, tendo sido parcial em 4/9 doentes do grupo um e significativa em 1/5 doentes do grupo dois. No grupo três, houve uma resposta ao tratamento em 6/10 doentes. Os autores deste ensaio concluíram que houve uma resposta maior no grupo com maior dose de células CAR T e prévia linfodepleção, tendo sugerido que a ciclofosfamida permite uma proliferação das células mais acentuada e durante mais tempo. (41)

Outro estudo clínico em curso, cujos resultados preliminares foram também apresentados na Reunião Anual da ASH 2017, tem como objetivo encontrar a dose máxima eficaz de células CAR T de segunda geração (com um domínio coestimulatório 4-1BB e scFV anti-BCMA de

murino) que apresente toxicidade tolerável. Para tal, foram administradas uma de quatro doses de células CAR T (50, 150, 450 ou 800 x 10<sup>6</sup> células) a 21 doentes com MM recidivante ou refratário aos tratamentos anteriores, cuja expressão do BCMA ocorresse em mais de 50% das células de MM. Fludarabina e ciclofosfamida foram os fármacos usados para causar a linfodepleção prévia ao tratamento com células CAR T. Foi obtida uma resposta em 17/21 doentes, dos quais 17/18 foram tratados com dose igual ou superior a 150 x 10<sup>6</sup> células. Esta resposta manteve-se durante mais de um ano em 5/21 doentes, apesar de a doença ter progredido em 4/21 doentes num período de 40 semanas após o tratamento. Nenhum dos doentes apresentou neurotoxicidade associada à terapêutica ou dependente da dose, pelo que esta se revelou uma opção promissora no tratamento do MM recidivante ou refratário. (42)

Recentemente, foram apresentados resultados de um outro estudo, em que se utilizaram células CAR T capazes de reconhecer dois diferentes epítomos do BCMA (LCAR-B38M). Neste ensaio clínico, participaram 57 doentes com MM em recidiva ou refratário, tratados com uma média de 3 linhas terapêuticas prévias. As células T foram obtidas do sangue periférico do próprio doente, tendo-se usado o lentivírus como vetor no processo de transdução. Os doentes sofreram linfodepleção, induzida por ciclofosfamida, 5 dias antes da infusão das células CAR T, cuja dose total administrada foi de 0,07 - 2,1 x 10<sup>6</sup> células/kg, dividida em 3 perfusões (20, 30 e 50%) durante 7 dias. Dos 57 doentes, 50 responderam ao tratamento: 39 doentes apresentaram uma resposta completa (com *progression free survival* (PFS) mediana de 24 meses), 3 doentes tiveram uma resposta parcial muito boa e os restantes alcançaram uma resposta parcial (PFS de 15 meses). Em média, o início de resposta ao tratamento demorou 1 mês e a duração da resposta foi de 14 meses. De salientar que não foi encontrada correlação entre a resposta clínica e o grau de expressão do BCMA. Em comparação com outros estudos usando CAR-BCMA, a utilização das LCAR-B38M obteve uma taxa de resposta global maior com doses menores. Perante estes resultados promissores, os investigadores iniciaram um novo ensaio clínico (NCT03548207). (43)

#### Células CAR T anti-CD19

As células CAR T anti-CD19 têm sido sobretudo usadas em ensaios clínicos como opção no tratamento de doenças hematológicas malignas. Trata-se de um antigénio expresso na superfície das células B, sejam estas precursoras, maduras ou malignas, como ocorre no linfoma não-Hodgkin e na leucemia linfoblástica aguda de células B, para os quais a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou recentemente tratamentos com células CAR T. (44) Apesar de não ser comum a expressão do CDm19 nas células malignas do MM, pensa-se

que tal se deva ao limiar de deteção das técnicas atualmente utilizadas (citometria de fluxo e imunohistoquímica) e que a sua expressão seja mais relevante ao nível das células B progenitoras e reguladoras, que têm um papel fundamentalmente imunossupressor no microambiente do MM. Assim, a eliminação deste nicho celular poderia potenciar a ação antitumoral dos linfócitos endógenos, revelando-se um alvo atrativo no MM. (45)

Nesse sentido, foi realizado um ensaio clínico piloto para determinar o potencial benefício de associar o uso de células T autólogas com recetor quimérico anti-CD19 a um segundo transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas (AHSCT). Para tal, 10 doentes, que tinham apresentado uma resposta de curta duração (PFS inferior a 1 ano) a um prévio AHSCT, foram submetidos a um segundo AHSCT, após linfodepleção com melfalano (140-200 mg/m<sup>2</sup>). Duas semanas depois, foi realizada a administração de células CAR T anti-CD19 numa concentração máxima de 5 x 10<sup>7</sup> células. No dia 100 após o tratamento, verificou-se que 8/10 doentes alcançaram pelo menos resposta parcial, apesar de somente 2/10 apresentarem uma PFS2 superior (479 e 249 dias) à PFS1 obtida com o primeiro AHSCT (181 e 127 dias, respetivamente), em que não tinham sido tratados com células CAR T. No entanto, quando comparado com o decréscimo expectável de PFS nos doentes quando submetidos a um primeiro e segundo AHSCT (média PFS2/PFS1 0,33), foi possível concluir que houve um potencial benefício clínico na utilização das células CAR T anti-CD19 (média PFS2/PFS1 0,95). Aliás, verificou-se que os doentes com níveis de células CAR T detetáveis na MO durante mais tempo apresentaram PFS superior, progressão clínica mais indolente e uma resposta mais duradoura à terapêutica subsequente, sugerindo que estas células CAR T podem alterar o prognóstico da doença. (46)

### Células κ.CAR T

Uma questão descrita nas células CAR T que apresentam como alvo um antigénio expresso na superfície de todas as células B é o desenvolvimento de hipogamaglobulinémia, com consequente imunodepressão severa. Tendo em conta este facto e sabendo que o MM pode apresentar dois subtipos de cadeias leves (κ e λ), uma estratégia possível seria desenhar células CAR T direcionadas a um dos subtipos, evitando assim atacar as células B normais. Nesse sentido, foram criadas as células κ.CAR T, de segunda geração, cujo alvo é a cadeia leve κ. Foi depois realizado um ensaio clínico com 7 doentes que apresentavam doença ativa, sujeitos a pelo menos um ciclo de quimioterapia há mais de 4 semanas. A linfodepleção foi feita com uma dose única de ciclofosfamida (12,5 mg/kg), à qual se seguiu, 4 dias depois, a administração de células κ.CAR T numa concentração entre 0,9-1,9 x 10<sup>8</sup> células/m<sup>2</sup>. Apenas

em 4/7 doentes se conseguiu estabilizar a doença, num período compreendido entre as 6 semanas e os 24 meses. Pensa-se que dois fatores poderão ter contribuído para esta atividade diminuída das células CAR T que usam como alvo uma das cadeias leves: por um lado, o facto de a elevada concentração de cadeias leves livres poder diminuir a capacidade de reconhecimento das células B malignas, e, por outro lado, o facto de as células B malignas não reterem as imunoglobulinas à superfície, evitando assim a ligação das células CAR T. (47)

#### Células CAR T anti-CD138

O CD138, ou *syndecan-1*, é uma molécula expressa à superfície dos plasmócitos, quer normais quer tumorais, estando envolvido no desenvolvimento e proliferação celular. (48) Foi realizado um ensaio clínico com células CAR T anti-CD138, de segunda geração (com um domínio coestimulatório 4-1BB), usando o lentivírus como vetor, em doentes com MM resistente ao tratamento ou recidivante. Para isso, foram selecionados 5 doentes que expressassem o CD138 à superfície das células do MM e, como estas células CAR T nunca tinham sido testadas, administradas 3-6 doses num total de  $7,56 \times 10^6$  células/kg. Apesar de todos os doentes terem subsequente aumento dos níveis de células CAR T, só em 4 deles se verificou uma estabilização da doença durante 3 a 6 meses. (49)

### **2.1.3. Ensaio pré-clínicos**

#### Células CAR T anti-CD38

O CD38 é uma glicoproteína transmembranar que está envolvida na adesão celular, na transdução de sinal e na regulação do cálcio. É expressa consistentemente nos plasmócitos malignos e ainda nas células B precursoras, plasmócitos normais, células T, células NK e células precursoras da linha mieloide. Também é expressa em células não hematológicas, como os osteoclastos, as células musculares do intestino, as células da próstata e as células do sistema nervoso. (50)

Os resultados promissores de estudos clínicos usando anticorpos monoclonais no tratamento do MM, com aprovação pela FDA, como o daratumumab (anticorpo monoclonal contra o CD38) em 2015, motivaram a criação de células CAR T contra este alvo terapêutico. Assim, ficou demonstrado, num estudo pré-clínico, que as células CAR T anti-CD38 têm a capacidade de proliferação, produção de citocinas e lise de células que expressem CD38 à superfície, quer estas sejam malignas quer sejam normais. (51) Numa tentativa de modular a afinidade

das células CAR T anti-CD38, os investigadores criaram um novo CAR com alteração exclusiva da cadeia leve do anticorpo, mantendo igual especificidade para o epítipo. De facto, as novas células CAR T anti-CD38, após seleção criteriosa, vieram resolver esse problema, apesar de globalmente terem menor afinidade. (52)

Outra abordagem proposta é a incorporação de *nanobodies* contra o CD38 nas células T. Os *nanobodies* são domínios variáveis da cadeia pesada dos anticorpos, que têm despertado interesse por serem mais pequenos, mais estáveis, e exibirem maior afinidade e solubilidade. Recentemente, foi realizado um ensaio pré-clínico usando células CAR T anti-CD38, de segunda geração (com um domínio coestimulatório 4-1BB), com introdução desta tecnologia. Os resultados *in vitro* foram muito promissores, apresentando elevada eficácia citotóxica contra as células do MM com expressão de CD38, embora com ligeira citotoxicidade para outras células (B, T e NK). Quando testadas *in vivo*, demonstraram uma atividade antitumoral considerável, com redução mensurável do volume e do peso da massa tumoral. (53)

#### Células CAR T anti-CS1

O CS1, também conhecido por CD319, é uma glicoproteína de superfície da família dos recetores de sinalização de moléculas ativadoras dos linfócitos, com uma forte expressão nos plasmócitos normais e células do MM (em mais de 95% dos casos), mas pouco expresso nas células NK e sem expressão noutros tecidos. Dada a potencial especificidade que pode conferir ao tratamento, tem-se revelado um alvo interessante para o uso de células CAR T.

Num ensaio pré-clínico, foram testadas células CAR T anti-CS1, de segunda geração, com um domínio coestimulatório CD28. Os resultados *in vitro* e *in vivo* vieram demonstrar que estas células CAR T têm atividade citolítica contra as células do MM e que, em combinação com a lenalidomida, ocorre um aumento considerável e persistente desta atividade antitumoral, motivando a sua futura utilização em ensaios clínicos. (54)

#### Outras células CAR T

Existem outros alvos terapêuticos ainda em investigação, cujos resultados não foram discutidos neste trabalho. Destes, destaca-se o papel do CD44v6 (variante 6 da glicoproteína de membrana CD44), que tem um padrão de expressão restrito e está presente em 43% dos casos de MM avançado, do CD70, cujo padrão de expressão é limitado aos tecidos linfoides, e do CD56, que se trata de uma glicoproteína mediadora nas interações célula-célula e célula-matriz. (55)

#### 2.1.4. Efeitos adversos

As células CAR T têm sido alvo de intensa investigação no tratamento de várias doenças hematológicas, com particular ênfase no MM. No entanto, apesar dos resultados interessantes em ensaios pré-clínicos e clínicos, alguns dos efeitos adversos a que os doentes são sujeitos não são de todo negligenciáveis, podendo, em casos mais graves, colocar a vida em risco. Aqueles que mais frequentemente têm sido associados à utilização das células CAR T são: a síndrome de libertação de citocinas (CRS), a síndrome de encefalopatia relacionada com as células CAR T (CRES) e a linfocitose hemofagocítica (HLH) fulminante. (56)

##### Síndrome de libertação de citocinas

A CRS é o efeito tóxico mais frequente, sendo desencadeado pela ativação intensa das células T administradas, com conseqüente libertação de grandes quantidades de citocinas e quimiocinas (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-6 e GM-CSF). Estas substâncias pró-inflamatórias conduzem à ativação de várias células, nomeadamente células dendríticas (DCs), monócitos e/ou macrófagos que, por sua vez, secretam IL-10, IL-6, IL-8 e IFN $\alpha$ . (57)

Alguns fatores de risco foram associados a maior probabilidade de desenvolvimento de CRS, nomeadamente tumores de alta malignidade ou rápida progressão e a administração de uma maior dose de células CAR T. No entanto, o diagnóstico da CRS exige especial atenção por parte do médico, dado que, frequentemente, o doente apenas apresenta sintomas constitucionais (febre, mal-estar, anorexia e mialgias), apesar de os sistemas cardiovascular, respiratório, gastrointestinal e renal poderem ser também afetados. (58) Assim, sempre que o doente apresenta, nas primeiras 3 semanas após imunoterapia, febre, tensão sistólica inferior a 90 mmHg, saturação de oxigénio inferior a 90% (FiO $_2$  21%) ou toxicidade de órgão, deve suspeitar-se de CRS. (56) Alguns biomarcadores podem reforçar a possibilidade de CRS, nomeadamente valores aumentados de proteína C reativa (valor superior a 20 mg/L), IFN $\gamma$ , gp130 solúvel, IL-5, IL-6 e IL-8. (57) Por essa razão, é aconselhada uma monitorização mais atenta do doente na primeira semana após a perfusão das células CAR T, de modo a permitir uma deteção e atuação precoces nesta síndrome. (56)

*Lee et al.* propuseram um sistema de graus de gravidade da CRS com o principal objetivo de facilitar a adequação do tratamento (**Table 1**). (58) Assim, de forma a maximizar o efeito terapêutico, não é recomendado eliminar todos os sintomas associados à CRS, mas somente atuar na prevenção de situações ameaçadoras à vida. No caso de CRS severa, devem ser

usados antagonistas IL-6 ou IL-6R, tendo sido aprovada pela FDA, em 2017, a utilização de tocilizumab. (56) Caso este não seja eficaz, o uso de corticoides constitui o tratamento de segunda linha aconselhado, não obstante a supressão da resposta inflamatória com subsequente inibição do efeito antitumoral das células CAR T.

Os diversos estudos realizados permitem concluir que a dose de células CAR T administrada é um dos fatores preponderantes para o desenvolvimento de toxicidade no doente. Deste modo, no ensaio clínico realizado por *Kochenderfer et al.*, os doentes que receberam menor dose de células CAR T (7/12 doentes) tiveram uma toxicidade mínima, aqueles com dose média (3/12) apresentaram sintomas moderados (febre moderada, taquicardia e hipotensão) e os que receberam dose mais alta (2/12) desenvolveram toxicidade de grau 3 e 4, requerendo tratamento com tocilizumab. (39) De igual modo, *Cohen et al.* reportaram o desenvolvimento de CRS em 5/24 doentes, tendo 2/5 exibido toxicidades grau 1, 1/5 grau 2 e 2/5 grau 3, com necessidade de tratamento com tocilizumab. (41) *Berdeja et al.*, por sua vez, descreveram a ocorrência de CRS severa em apenas 2/21 doentes envolvidos no estudo. (42) Ao invés, 51/57 doentes que participaram no estudo realizado por *Zhao et al.* desenvolveram CRS, em que 42/51 tiveram CRS ligeira (graus 1 e 2) e os restantes apresentaram CRS severa, requerendo tratamento com tocilizumab, vasopressores e oxigenioterapia. (43) Noutros ensaios clínicos apresentados neste trabalho, não houve referência à ocorrência de CRS após o tratamento, sendo que tal pode ser devido ao uso de doses mais baixas de células CAR T.

**Tabela 1 – Sistema de graus de severidade da síndrome de libertação de citocinas (adaptado de Lee et al., 2014).**

Grau	Toxicidade
1	Sintomas não ameaçadores à vida (febre, náuseas, fadiga, cefaleia, mialgias, mal-estar): Tratamento sintomático
2	Sintomas que só respondem a intervenção moderada: Necessidade de oxigénio <40%, ou Hipotensão responsiva a fluídos e baixa dose de um vasopressor, ou Toxicidade orgânica grau 2
3	Sintomas que só respondem a intervenção moderada: Necessidade de oxigénio ≥40%, ou Hipotensão requerendo alta dose ou múltiplos vasopressores, ou Toxicidade orgânica (grau 3) ou aumento das transaminases (grau 4)
4	Sintomas ameaçadores à vida: Necessidade de suporte ventilatório, ou Toxicidade orgânica (grau 4, excluindo aumento das transaminases)
5	Morte

### Síndrome de encefalopatia relacionada com as células CAR T

A CRES é menos frequente que a CRS e manifesta-se como uma encefalopatia tóxica. Tipicamente, manifesta-se com diminuição da atenção, alterações na linguagem, agitação, desorientação, sonolência e tremores. Em situações mais severas, o doente pode apresentar aumento da pressão intracraniana, edema das papilas, edema cerebral e incontinência. (56)

Ainda não são conhecidos os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à CRES, no entanto, pensa-se que podem estar associados a uma difusão passiva de citocinas para o cérebro ou a um redirecionamento das células T para o sistema nervoso central. De facto, é possível encontrar estados epilépticos não convulsivos em alguns doentes tratados com células CAR T, achados esses confirmados por eletroencefalografia. (56)

Nos ensaios clínicos acima descritos, apenas um doente em cada estudo apresentou alterações neurológicas, manifestando sobretudo delírio, afasia, agitação e atividade tipo convulsão. (39, 41-43) Estes doentes foram tratados com tocilizumab, exceto neste último, em que foi necessário recorrer às benzodiazepinas.

### Linfocitose hemofagocítica fulminante

A HLH fulminante é uma desordem caracterizada por hiperativação de macrófagos e linfócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltração linfocítica dos tecidos e falência multiorgânica mediada pelo sistema imune. A clínica e os achados laboratoriais assemelham-se à CRS, no entanto, a HLH fulminante é mais rara e, frequentemente, associa-se a resistência ao tratamento com anti-IL6 e corticoterapia. (56)

Assim, se o doente não tiver melhoria clínica ou serológica nas 48 horas após o início do tratamento, deve adicionar-se etopósido ao tratamento, numa dose de 75-100 mg/m<sup>2</sup>. Se o doente, para além da HLH fulminante, apresentar também envolvimento neurológico, pode ainda considerar-se a administração intratecal de citarabina, com ou sem hidrocortisona. (56)

### Outros

Outros potenciais efeitos adversos descritos como associados ao tratamento com células CAR T incluem: anafilaxia (quando os scFv não são humanizados), síndrome de lise tumoral, destruição de células normais do doente (caso as células CAR T não sejam suficientemente específicas) e a oncogénese insercional, pela transferência de transgenes virais para as células T que possam levar à indução de malignidade nas células do doente. (59)

## 2.2. Vacinas

A utilização de vacinas tumorais no tratamento do MM constitui uma outra abordagem que se encontra sob investigação. Em termos práticos, o objetivo passa pela administração de antígenos imunogênicos específicos do tumor do doente, de forma a reeducar o seu sistema imunológico para que os reconheça como estranhos, levando à proliferação de linfócitos contra as células tumorais e gerando memória imunológica capaz de evitar recidivas da doença. (60) Apesar de apresentarem menor toxicidade para o doente comparativamente a outras terapêuticas citotóxicas, as vacinas têm sido testadas em associação, na maioria dos casos, de modo a que se obtenha uma resposta mais eficaz e duradoura. (61) No caso particular do MM, o foco de atenção tem recaído sobretudo na aplicabilidade de dois tipos específicos de vacinas: as pépticas e as que introduzem DCs previamente ativadas. (62)

### 2.2.1. Vacinas pépticas

As vacinas pépticas são constituídas por antígenos, obtidos a partir das proteínas tumorais presentes nas células do MM, e adjuvantes (como o GM-CSF e os *Toll-Like Receptors*), cuja função será potenciar a ativação do sistema imune através do recrutamento das APCs nativas. (62) Assim, depois de injetados no doente, os péptidos irão ser processados pelas APCs, sendo depois apresentados às células T, que adquirem a capacidade de reconhecer e destruir os epítomos expressos à superfície das células malignas. (63) Esta indução de resposta imunológica, tanto celular como humoral, foi verificada em ensaios clínicos *in vivo*, no entanto, sem que tal se traduzisse numa melhoria clínica efetiva dos doentes avaliados. Pensa-se que vários fatores poderão ter contribuído para esta discrepância, nomeadamente a restrição HLA (*Human Leukocyte Antigen*), a eventual incompetência do sistema imune inato e a diminuição da resposta mediada por linfócitos T citotóxicos, por subexpressão tumoral do antígeno selecionado. (62)

Numa tentativa de minimizar esta última dificuldade, foram desenvolvidas vacinas pépticas com múltiplos antígenos (MAP) do MM, de forma a aumentar a ativação das DCs e das células T. (62) A PVX-410 (PVX) constitui a vacina deste grupo mais estudada atualmente, sendo composta por quatro peptídeos HLA-A2 (CD138, CS1 e duas isoformas da *X-box binding protein 1*). O seu potencial terapêutico no atraso da progressão do MM foi testado quer isoladamente quer em associação com a lenalidomida em 22 doentes com mieloma múltiplo indolente. Para tal, três doentes receberam baixa dose da vacina (0,4 mg), nove receberam alta dose (0,8 mg) e dez receberam alta dose associada a três ciclos de tratamento com lenalidomida (25 mg). Apesar de se verificar uma resposta imunológica em

21/22 doentes, somente 17/22 doentes apresentaram resposta clínica, tendo esta sido mais acentuada naqueles que realizaram tratamento combinado (1/9 com resposta parcial e 4/9 com resposta mínima e estabilização da doença) comparativamente ao tratamento isolado com PVX (12/12 com estabilização da doença, dos quais 5/12 com progressão num período de um ano). Neste ensaio, o tratamento com a PVX isolada ou em associação demonstrou ter uma boa resposta imunogénica em doentes com mieloma múltiplo indolente, sendo contudo necessários mais estudos com o objetivo de melhorar a resposta clínica. (64)

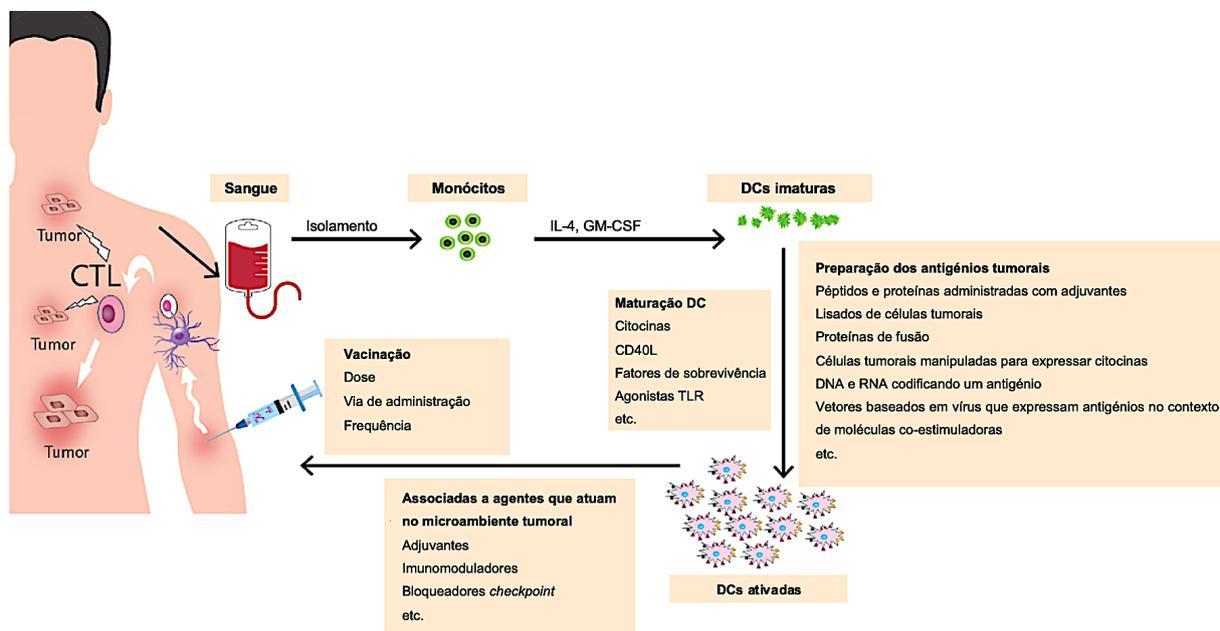
Mais recentemente surgiu uma vacina péptica que tem como antigénio a *Dickkopf-related protein 1* (DKK1), uma proteína quase exclusivamente expressa nas células do MM que tem um papel crucial no aparecimento das lesões osteolíticas na doença avançada. Até ao momento, a vacina encontra-se em fase de ensaios pré-clínicos, tendo sido o último realizado em murinos com uma vacina de fusão do xeno-antigénio humano DKK1 com a *Heat Shock Protein 70* (HSP70) humana como adjuvante. Verificou-se que a vacina foi capaz de induzir atraso na progressão tumoral, conferindo maior sobrevida aos murinos tratados, sem que tal tenha sido associado à presença de efeitos adversos marcados. (65)

### **2.2.2. Vacinas com células dendríticas**

A criação de vacinas com DCs assenta no pressuposto de contrariar a ação inibitória que o MM tem sobre a função das APCs (na qual as DCs se incluem). (66) No processo de formulação, são colocados monócitos em meio de cultura com GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  e antigénios de células malignas do MM. Posteriormente, as DCs criadas *ex vivo* são injetadas no doente, onde migram para os órgãos linfoides secundários e ativam as células T CD8<sup>+</sup> que secretam citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da IL-12 (**Fig. 6**). (62)

As *idiotype-pulsed DCs vaccines* constituem as primeiras vacinas de DCs testadas em ensaios clínicos. Sabe-se que as proteínas *idiotype* são regiões variáveis das imunoglobulinas que medeiam a ligação dos anticorpos com antigénios específicos, pelo que a sua incorporação nas vacinas faria antever uma resposta imunológica potente. (66) Este facto veio a confirmar-se e a resposta clínica subsequente ficou aquém do esperado. Pensa-se que tal possa ser devido a uma diminuição da expressão destas proteínas nas células tumorais, pelo que o recurso à engenharia genética, com a introdução de vários antigénios tumorais nas vacinas, bem como o tratamento combinado com drogas imunomoduladoras possa constituir uma alternativa terapêutica mais eficaz. (66) Em ensaios pré-clínicos com murinos, foi possível verificar que o tratamento combinado com lenalidomida ou pomalidomida teve um efeito sinérgico muito positivo na indução de atividade anti-mieloma. (67)

Outra possível abordagem é a criação de uma vacina com hibridomas, em que se fundem as células do MM de um determinado doente com DCs autólogas ou alogénicas, previamente expandidas e maturadas *ex vivo*. (62) Esta estratégia foi testada num ensaio clínico com 36 doentes, em que 24/36 receberam três doses de vacina após a realização de AHST (início nos três dias após transplante, com restantes reforços espaçados de 4 semanas) e os restantes haviam recebido uma dose adicional antes do transplante. Os resultados foram bastante animadores, apresentando não só uma boa resposta imunológica, com duplicação da produção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, mas também resposta clínica eficaz, já que 28/36 doentes obtiveram uma resposta completa ou parcial muito boa. (68)



**Figura 6** – Processo de vacinação com células dendríticas (DCs) nos doentes com mieloma múltiplo (MM). A função das DCs está alterada em doentes com MM, pelo que a cultura de DCs *ex vivo* e posterior administração pela vacinação pode ajudar a superar esta desregulação no microambiente tumoral. Para isso, obtêm-se monócitos circulantes do doente e diferenciam-se em DCs imaturas por cultura *in vitro* com interleucina 4 (IL-4) e *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Tanto a subsequente maturação das DCs como a preparação dos antígenos tumorais ocorre com a presença de vários estímulos. Uma vez ativadas, as DCs são associadas a adjuvantes e agentes que facilitem a sua ação no microambiente tumoral. Num último passo, é necessário otimizar as diversas variáveis relacionadas com a vacinação especificamente, de modo a induzir uma resposta imune específica e efetiva contra o MM. CD40, *cluster of differentiation 40 ligand*; CTL, *cytotoxic T lymphocyte*; TLR, *toll-like receptor*. (Adaptado de Vo *et al.*, 2018)

A associação de vacinas de DCs com outras terapêuticas anticancerígenas, que possam promover a função destas células, constitui outra linha de investigação emergente. Recentemente, foram realizados ensaios pré-clínicos em murino com tratamento combinado de vacinas de DCs com lenalidomida e antagonistas PD-1. Este estudo demonstrou uma ação sinérgica com aumento da eficácia vacinal, tanto pela inibição da proliferação de células imunossupressoras e da resposta imune Th2, como pela proliferação das células efetoras e da resposta imune Th1. Apesar de serem necessários mais estudos, os resultados obtidos mostraram que esta constitui atualmente uma abordagem promissora para o tratamento do MM. (68)

## **Discussão e Conclusão**

Nas últimas décadas, houve um grande esforço da comunidade científica para esclarecer o comportamento das células do MM e a sua interação com o meio. Sabe-se que o MM surge na sequência de múltiplas alterações dos plasmócitos, com acumulação de mutações genéticas e alterações epigenéticas, que contribuem para o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência à apoptose e às estratégias terapêuticas atualmente existentes. No entanto, só com os avanços mais recentes no conhecimento do microambiente tumoral foi possível determinar um conjunto de alvos terapêuticos potencialmente mais específicos e decisivos na progressão da doença, que permitam tratamentos passíveis de prolongar a sobrevida dos doentes e minimizar os efeitos secundários associados. Assim, tendo em conta a imunossupressão sistémica mediada pelo tumor, umas das estratégias propostas passa pela utilização de agentes imunologicamente ativos que estimulem a atuação do sistema imune especificamente contra as células do MM. Dentro desta abordagem, a utilização de células CAR T e de vacinas tumorais constitui um dos focos da investigação atual.

O desenvolvimento e utilização das células CAR T em ensaios clínicos tem apresentado resultados muito promissores, com especial destaque para as anti-BCMA, que têm sido as mais extensamente estudadas até à data. No entanto, é de salientar que muitos destes ensaios foram aplicados a pequenos grupos de doentes, submetidos a vários tratamentos prévios e durante períodos de tempo não comparáveis entre si. Assim, seria importante a realização de estudos de maior dimensão, com parâmetros comparáveis e padronizados que permitam tirar conclusões definitivas quanto à aplicabilidade das células CAR T no tratamento do MM. Como exemplos dessas variáveis, estão a definição dos critérios de inclusão (como a idade dos doentes, o número e tipo de tratamentos prévios, bem como o perfil de expressão do alvo terapêutico) e a construção das células CAR T (domínio extracelular derivado de murino ou humanizado, tipo de vetor usado na introdução do CAR nas células T, ou ainda o uso de células CAR T de diferentes gerações). Para além disso, são necessários estudos adicionais que permitam determinar a dose mínima eficaz de forma a reduzir os efeitos secundários e otimizar os efeitos terapêuticos, confirmar o benefício das células CAR T comparativamente ao placebo e às terapêuticas atualmente em uso (quer isoladamente quer em associação), bem como a vantagem da linfodepleção prévia à administração das células CAR T. No futuro, o conhecimento do perfil de expressão das células dos doentes poderá constituir uma ferramenta com grande potencial para que se crie um conjunto de terapêuticas dirigidas cada vez mais adequadas à população alvo, com particular destaque para a utilização de células CAR T capazes de reconhecer múltiplos epítomos. De realçar também que mais estudos são necessários para que se perceba não só a vantagem desta terapêutica em termos analíticos,

mas também o seu impacto na clínica, no prognóstico e na qualidade de vida dos doentes com MM.

O interesse pela utilização isolada de vacinas no tratamento do MM, que inicialmente surgiu como opção promissora em ensaios pré-clínicos, veio a esmorecer após resultados menos animadores em ensaios clínicos. No entanto, o seu uso como terapêutica preventiva em doentes com risco elevado de desenvolver MM ou em associação em doentes com este diagnóstico carece ainda de um maior número de estudos que forneçam maior evidência científica. Realça-se que, mais uma vez, será importante definir potenciais efeitos secundários desta abordagem, bem como o real impacto no prognóstico e na qualidade de vida dos doentes.

Como um todo, pode concluir-se que a imunoterapia ativadora do sistema imune constitui uma abordagem francamente promissora que poderá mudar o paradigma do tratamento do MM. Apesar de mais estudos serem necessários para definitivamente comprovar o seu benefício, a eventual utilização de vacinas em doentes com risco de progressão para MM e das células CAR T no tratamento da doença refratária ou recidivante através da morte celular seletiva constitui uma abordagem sem precedentes face aos tratamentos *standard* e um avanço na procura da cura para o MM.

## **Agradecimentos**

Os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Catarina Geraldes e à Professora Doutora Ana Bela Sarmiento por toda a disponibilidade e orientação na elaboração da tese.

## Referências

1. Shay G, Hazlehurst L, Lynch CC. Dissecting the multiple myeloma-bone microenvironment reveals new therapeutic opportunities. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(1):21-35.
2. Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenor I, Curado MP, et al. Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol*. 2018;4(9):1221-7.
3. Smittenaar CR, Petersen KA, Stewart K, Moitt N. Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035. *Br J Cancer*. 2016;115(9):1147-55.
4. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(1):101-19.
5. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-48.
6. Rollig C, Knop S, Bornhauser M. Multiple myeloma. *Lancet*. 2015;385(9983):2197-208.
7. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3-9.
8. Kyle RA. Multiple myeloma: how did it begin? *Mayo Clin Proc*. 1994;69(7):680-3.
9. Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, Jacobson J, Zangari M, Anaissie E, et al. Treatment of multiple myeloma. *Blood*. 2004;103(1):20-32.
10. Neri P, Bahlis NJ, Lonial S. New Strategies in Multiple Myeloma: Immunotherapy as a Novel Approach to Treat Patients with Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(24):5959-65.
11. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017;14(2):100-13.
12. Walker BA, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Begum DB, Dahir NM, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2015;6:6997.
13. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016;127(24):2955-62.

14. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3049-58.
15. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(35):12885-90.
16. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):585-98.
17. Toscani D, Bolzoni M, Accardi F, Aversa F, Giuliani N. The osteoblastic niche in the context of multiple myeloma. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1335:45-62.
18. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1542-55.
19. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423(6937):349-55.
20. Raje N, Roodman GD. Advances in the biology and treatment of bone disease in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1278-86.
21. Caers J, Deleu S, Belaid Z, De Raeve H, Van Valckenborgh E, De Bruyne E, et al. Neighboring adipocytes participate in the bone marrow microenvironment of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 21. England2007. p. 1580-4.
22. Favaloro J, Brown R, Aklilu E, Yang S, Suen H, Hart D, et al. Myeloma skews regulatory T and pro-inflammatory T helper 17 cell balance in favor of a suppressive state. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(5):1090-8.
23. Noonan K, Marchionni L, Anderson J, Pardoll D, Roodman GD, Borrello I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2010;116(18):3554-63.
24. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Gorgun GT, Roccaro AM, et al. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev*. 2015;263(1):160-72.
25. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(2):720-4.

26. Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med.* 2017;9(9):1183-97.
27. Xu D, Jin G, Chai D, Zhou X, Gu W, Chong Y, et al. The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy. *Oncotarget.* 2018;9(17):13991-4004.
28. Gauthier J, Yakoub-Agha I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: Clinical data to date, current limitations and perspectives. *Curr Res Transl Med.* 2017;65(3):93-102.
29. Brocker T, Karjalainen K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;181(5):1653-9.
30. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 2002;20(1):70-5.
31. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther.* 2009;17(8):1453-64.
32. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1822-6.
33. Tammana S, Huang X, Wong M, Milone MC, Ma L, Levine BL, et al. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum Gene Ther.* 2010;21(1):75-86.
34. Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;4:92-101.
35. Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunol Rev.* 2011;244(1):115-33.
36. Tai YT, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood.* 2016;127(25):3225-36.
37. Sanchez E, Gillespie A, Tang G, Ferros M, Harutyunyan NM, Vardanyan S, et al. Soluble B-Cell Maturation Antigen Mediates Tumor-Induced Immune Deficiency in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(13):3383-97.

38. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2048-60.
39. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016;128(13):1688-700.
40. Bu DX, Singh R, Choi EE, Ruella M, Nunez-Cruz S, Mansfield KG, et al. Pre-clinical validation of B cell maturation antigen (BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2018;9(40):25764-80.
41. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Lacey SF, Lancaster E, Vogl DT, et al. B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-BCMA) for Multiple Myeloma (MM): Initial Safety and Efficacy from a Phase I Study. *Blood.* 2016;128(22):6.
42. Berdeja JG, Lin Y, Raje N, Munshi N, Siegel D, Liedtke M, et al. Durable Clinical Responses in Heavily Pretreated Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Multicenter Study of bb2121 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):740.
43. Zhao WH, Liu J, Wang BY, Chen YX, Cao XM, Yang Y, et al. A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):141.
44. Li ZH, Song WR, Rubinstein M, Liu DL. Recent updates in cancer immunotherapy: a comprehensive review and perspective of the 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing. *Journal of Hematology & Oncology.* 2018;11.
45. Ghosh A, Mailankody S, Giralt SA, Landgren CO, Smith EL, Brentjens RJ. CAR T cell therapy for multiple myeloma: where are we now and where are we headed? *Leuk Lymphoma.* 2018;59(9):2056-67.
46. Garfall AL, Stadtmauer EA, Hwang WT, Lacey SF, Melenhorst JJ, Krevvata M, et al. Anti-CD19 CAR T cells with high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation for refractory multiple myeloma. *JCI Insight.* 2018;3(8).
47. Ramos CA, Savoldo B, Torrano V, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, et al. Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated kappa light chains. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2588-96.

48. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996;94(2):318-23.
49. Guo B, Chen M, Han Q, Hui F, Dai H, Zhang W, et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. *Journal of Cellular Immunotherapy.* 2016;2(1):28-35.
50. Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E, et al. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(4):207-17.
51. Drent E, Groen RW, Noort WA, Themeli M, Lammerts van Bueren JJ, Parren PW, et al. Pre-clinical evaluation of CD38 chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica.* 2016;101(5):616-25.
52. Drent E, Themeli M, Poels R, de Jong-Korlaar R, Yuan H, de Bruijn J, et al. A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Molecular Therapy.* 2017;25(8):1946-58.
53. An N, Hou YN, Zhang QX, Li T, Zhang QL, Fang C, et al. Anti-Multiple Myeloma Activity of Nanobody-Based Anti-CD38 Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Pharm.* 2018;15(10):4577-88.
54. Wang XL, Walter M, Urak R, Weng LH, Huynh C, Lim L, et al. Lenalidomide Enhances the Function of CS1 Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells Against Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(1):106-19.
55. Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood.* 2017;130(24):2594-602.
56. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(1):47-62.
57. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, Melenhorst JJ, Maude SL, Frey N, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(6):664-79.
58. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014;124(2):188-95.
59. Elahi R, Khosh E, Tahmasebi S, Esmaeilzadeh A. Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Front Immunol.* 2018;9:1717.

60. Boussi L, Niesvizky R. Advances in immunotherapy in multiple myeloma. *Curr Opin Oncol.* 2017;29(6):460-6.
61. Garfall AL, Stadtmauer EA. Cellular and vaccine immunotherapy for multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):521-7.
62. Liegel J, Avigan D, Rosenblatt J. Cellular immunotherapy as a therapeutic approach in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol.* 2018;11(7):525-36.
63. Klausen U, Holmberg S, Holmstrom MO, Jorgensen NGD, Grauslund JH, Svane IM, et al. Novel Strategies for Peptide-Based Vaccines in Hematological Malignancies. *Front Immunol.* 2018;9:2264.
64. Nooka AK, Wang ML, Yee AJ, Kaufman JL, Bae J, Peterkin D, et al. Assessment of Safety and Immunogenicity of PVX-410 Vaccine With or Without Lenalidomide in Patients With Smoldering Multiple Myeloma: A Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(12):e183267.
65. Liu TT, Wu Y, Niu T. Human DKK1 and human HSP70 fusion DNA vaccine induces an effective anti-tumor efficacy in murine multiple myeloma. *Oncotarget.* 2018;9(1):178-91.
66. Galati D, Zanotta S. Hematologic neoplasms: Dendritic cells vaccines in motion. *Clin Immunol.* 2017;183:181-90.
67. Vo MC, Lakshmi TJ, Jung SH, Cho D, Park HS, Chu TH, et al. Cellular immunotherapy in multiple myeloma. *Korean J Intern Med.* 2019.
68. Rosenblatt J, Avivi I, Vasir B, Uhl L, Munshi NC, Katz T, et al. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3640-8.