

**“V Beca Unoentrecienmil”**

**RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO NKG2D PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA Y LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL: VALIDACIÓN A ESCALA CLÍNICA Y PRIMER ESTUDIO DE SEGURIDAD EN PACIENTES: (GAb<sub>y</sub> cells: CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>)**

## Equipo de investigadores:

### Investigador Principal (IP)

Antonio Pérez Martínez: [aperezmartinez@salud.madrid.org](mailto:aperezmartinez@salud.madrid.org)

### Grupo de Investigación en Hematología, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Lucía Fernández Casanova [lvfernandez@cnio.es](mailto:lvfernandez@cnio.es)

Joaquín Martínez López [jmarti01@med.ucm.es](mailto:jmarti01@med.ucm.es)

### Grupo de Investigación Traslacional en Cáncer infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular, Instituto de Investigación del Hospital La Paz (IdiPAZ).

Isabel Mirones Aguilar [Isabel.mirones@idipaz.es](mailto:Isabel.mirones@idipaz.es)

Jaime Valentín Quiroga [jaime.valentin.quiroga@idipaz.es](mailto:jaime.valentin.quiroga@idipaz.es)

María Vela Cuenca [maria.vela@idipaz.es](mailto:maria.vela@idipaz.es)

Pablo González Navarro [pablo.gonzalez.navarro@idipaz.es](mailto:pablo.gonzalez.navarro@idipaz.es)

### Grupo de Investigación Traslacional en Cáncer infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular, Laboratorio de Genética Molecular en Hemato-Oncología Pediátrica, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital La Paz.

Adela Escudero López [adela.escudero@salud.madrid.org](mailto:adela.escudero@salud.madrid.org)

Leila Cabral de Almeida Cardoso [leila.cardoso@idipaz.es](mailto:leila.cardoso@idipaz.es)

### Servicio de Hematología, Hospital La Paz:

Raquel de Paz [mraquelde.paz@salud.madrid.org](mailto:mraquelde.paz@salud.madrid.org)

### Unidad de Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital La Paz:

Yasmina Mozo del Castillo [yasmina.mozo@salud.madrid.org](mailto:yasmina.mozo@salud.madrid.org)

Berta González Martínez [berta.gonzalez@salud.madrid.org](mailto:berta.gonzalez@salud.madrid.org)

Blanca Rosich del Cacho [blanca.rosich@salud.madrid.org](mailto:blanca.rosich@salud.madrid.org)

David Bueno Sánchez [david.bueno@salud.madrid.org](mailto:david.bueno@salud.madrid.org)

### Servicio de Inmunología, Hospital La Paz:

Eduardo López Granados [elgranados@salud.madrid.org](mailto:elgranados@salud.madrid.org)

### Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos

Pedro de la Oliva [pedro.oliva@salud.madrid.org](mailto:pedro.oliva@salud.madrid.org)

### Unidad Central de Investigación Clínica (UCICEC), Hospital La Paz:

Antonio Carcas Sansuán [antonio.carcas@uam.es](mailto:antonio.carcas@uam.es)

Alberto Borobia Pérez [alberto.borobia@idipaz.es](mailto:alberto.borobia@idipaz.es)

Hoi Yan Tong [hoi.tong@idipaz.es](mailto:hoi.tong@idipaz.es)

Mario Muñoz [marioa.munoz@salud.madrid.org](mailto:marioa.munoz@salud.madrid.org)

# RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO NKG2D PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA Y LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL: VALIDACIÓN A ESCALA CLÍNICA Y PRIMER ESTUDIO DE SEGURIDAD EN PACIENTES (GAbY cells: CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>)

## RESUMEN DEL PROYECTO:

La vía del receptor NKG2D en las células leucémicas ha emergido como un novedoso acercamiento terapéutico para eliminar los blastos leucémicos. Los receptores quiméricos antigénicos (CARs) son receptores artificiales que combinan la especificidad antigénica de los anticuerpos monoclonales con la citotoxicidad, expansión y la memoria inmunológica de los linfocitos T. Nuestro grupo ha descrito cómo los ligandos de NKG2D se expresan en la mayoría de las leucemias infantiles, linfoides y mieloides, mientras que su expresión es prácticamente nula en células sanas. Hemos observado que linfocitos T de memoria CD45RA<sup>-</sup> transducidos con un vector lentiviral para expresar el NKG2D-CAR mantienen su estabilidad genética y son eficaces eliminando blastos leucémicos *in vitro*, mientras que resultan inocuos frente a células sanas. Por lo que el tratamiento de pacientes pediátricos de leucemia aguda con células efectoras que expresan el NKG2D-CAR es una de las estrategias de terapia celular adoptiva más prometedoras. En este trabajo nos proponemos desarrollar, validar y obtener la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), un método automatizado de producción a escala clínica de linfocitos T de memoria NKG2D-CAR<sup>+</sup> en el CliniMACS Prodigy como terapia para el tratamiento de la leucemia en pacientes pediátricos de manera que pueda convertirse en una terapia accesible, asequible y de uso universal. En una etapa siguiente se realizará un ensayo clínico fase I para evaluar la seguridad de las “células GAbY: CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>”.

## SUMMARY:

The NKG2D receptor and its ligands have a main role in immune system and leukemic blast recognition. We have described how NKG2D ligands are expressed in most childhood leukemias. We also have observed memory T lymphocytes that are lentivirally transduced to express an NKG2D-CAR are effective eliminating leukemic blasts *in vitro*. Furthermore, memory T cells expressing NKG2D-CAR, preserve their genetic stability and are innocuous against healthy cells. NKG2D-CAR based cell therapy is a promising approach for pediatric acute leukemia patients. However, the *ex vivo* modification of T cells is currently limited to a small number of centers with the required infrastructure and expertise. We will develop a method for the automation and simplification of these procedures to obtain large numbers of clinical-grade NKG2D-CAR memory T cells. In addition we will develop a first human trial in for the treatment of pediatric acute leukemia.

# Estado actual del problema y referencias bibliográficas.

## INTRODUCCIÓN

### Interés:

Las terapias basadas en linfocitos T modificados para expresar receptores antigénicos quiméricos (CARs) han demostrado un enorme potencial en diversos ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con hemopatías malignas en situación de refractariedad terapéutica. El procedimiento para obtener linfocitos T CAR<sup>+</sup> requiere aislamiento celular, activación, transducción, expansión y en la mayoría de los casos, criopreservación. Aunque estos procedimientos están bien establecidos, solo un pequeño número de centros cuentan con la infraestructura y la experiencia necesarias para obtener un producto celular de alta calidad siguiendo la normativa Good Manufacturing Practice (GMP), que es un paso crítico en la aplicación clínica de esta terapia. La automatización de estos procedimientos de manipulación celular en un sistema cerrado, reproducible y eficiente permitirá la universalización de esta inmunoterapia emergente, beneficiando a un gran número de niños con leucemia que a día de hoy no tienen ningún tratamiento curativo para su enfermedad.

### Estado actual del tema

Las leucemias agudas, linfoides y mieloides, junto con la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) constituyen los cánceres más frecuentes en la edad pediátrica y la primera causa de muerte por enfermedad en la población infantil de 1 a 18 años. La leucemia aguda linfoblástica (LLA) constituye la hemopatía maligna más frecuente en los niños. Se diagnostican alrededor de 300 leucemias infantiles al año en nuestro país y en las últimas décadas se han conseguido alcanzar cifras de curación superiores al 80%. Sin embargo, la recaída y la refractariedad terapéutica condicionan un pronóstico infausto con supervivencias inferiores al 30% con los tratamientos actuales. La leucemia mieloide aguda (LMA) constituye la hemopatía aguda más frecuente en la población adulta y el segundo cáncer hematológico más frecuente en niños y adolescentes. En población pediátrica la incidencia es aproximadamente de 7 casos por millón de niños y año, y constituye el 5% de todos los cánceres infantiles. A pesar de sólo constituir el 20% de todas las leucemias infantiles, la supervivencia a 5 años oscila entre el 45-60%, lejos todavía de la supervivencia actual para la LLA infantil, siendo la recaída el fundamental problema clínico. La LMMJ es un trastorno clonal mielodisplásico del monocito cuyo único tratamiento curativo en el momento actual es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). En el momento actual la tasa de supervivencia se sitúa en el 40%, siendo la principal causa del fracaso la recaída.

Las estrategias actuales para mejorar la supervivencia se basan fundamentalmente en segundas líneas de quimioterapia y en su intensificación. Sin embargo, no han conseguido impactar en la supervivencia de la enfermedad en las últimas décadas; más aún, han aumentado la morbimortalidad. Por tanto, son necesarias nuevas estrategias terapéuticas. Los nuevos anticuerpos monoclonales, ya sea conjugados (inotuzumab ozogamicina) o biespecíficos (blinatumomab), han incrementado sensiblemente las respuestas terapéuticas, sin embargo, desafortunadamente estas respuestas apenas se mantienen unos meses. Por lo tanto, el tratamiento de las leucemias agudas en los niños precisa del desarrollo de nuevas terapias más eficaces y dirigidas con la mínima toxicidad a corto y largo plazo. En este sentido, los avances en la investigación básica, preclínica y clínica en los campos de la inmunología, la terapia génica y la biotecnología nos han permitido desarrollar nuevos tratamientos como los CAR.

**CAR:** En los últimos 4-5 años, varias instituciones de los Estados Unidos, y últimamente también de China, han desarrollado un nuevo tipo de terapia génica/celular llamada células CAR. Son proteínas "artificiales" que se expresan en diferentes células efectoras, fundamentalmente linfocitos T (CAR-T) y células Natural Killer (CAR-NK), y que permiten reconocer proteínas tumorales específicas (antígenos tumorales). Las células CART son células T derivadas del paciente (autólogas) transducidas con un gen quimérico que combina las funciones efectoras de las células T con la capacidad de los anticuerpos monoclonales para reconocer antígenos de superficie predefinidos. La función de unión al tumor se logra mediante la inclusión de un fragmento variable monocatenario (scFv) de un anticuerpo monoclonal, que contiene las cadenas VH y VL, unidas por un enlazador peptídico (que normalmente pertenece a la molécula CD8). Una amplia investigación ha documentado que la activación, proliferación y persistencia de las células T que responden a estímulos antigénicos depende de dos señales mediadas por receptores de la superficie celular. La señal de activación primaria se genera mediante la ligadura del receptor de células T (TCRζ [CD3z]) con el antígeno. La segunda señal se genera mediante la ligadura de moléculas coestimuladoras con sus ligandos, que incluyen miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (CD28) y miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) (p. Ej., CD40L, CD134 [OX-40] y CD137 [4-1BB]); esta última ha demostrado según Investigadores de la Universidad de Pensilvania como mejora significativamente la función y la proliferación de las células T. Esta estrategia de ingeniería terapéutica permite vencer la principal limitación de la terapia celular, como es la restricción de los antígenos tumorales a determinadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, en humanos sistema de antígenos leucocitarios (HLA). Por tanto la inmunoterapia con células CAR constituye una novedosa herramienta específica antitumoral que fusiona la fina especificidad de los anticuerpos monoclonales con la potente citotoxicidad de los linfocitos del sistema inmune mediante la ingeniería genética y la

inmunoterapia adoptiva. Hasta la fecha la mayoría de las células CART administradas a humanos se dirigen al antígeno CD19, que se expresa en células B normales pero también en la mayoría de los casos de LLA y otras enfermedades malignas de células B tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica. Cabe destacar que CD19 no se expresa en células madre sanguíneas pluripotentes ni en la mayoría de los tejidos normales distintos de las células B, lo que lo convierte en un objetivo relativamente seguro con un riesgo mínimo de enfermedades autoinmunes o mielotoxicidad irreversible. Los recientes resultados con células CART dirigidas al antígeno CD19 (células CART19) han sido muy impresionantes y reproducibles en pacientes con LLA refractaria. El Dr. Stephan Grupp del Children Hospital de Filadelfia ha sido pionero en esta estrategia que está permitiendo curar a pacientes pediátricos con LLA con inmunofenotipo B (CD19+) en fases muy avanzadas de la enfermedad con CAR-CD19 transducidos en linfocitos T autólogos. Se han alcanzado respuestas del 80% mantenidas durante más de 6 meses. Sin embargo, leucemias que no expresan CD19 (linfoblásticas de tipo T, mieloblásticas y mielomonocíticas), o aquellas que habiéndolo expresado han dejado de hacerlo, no son abordables con esta estrategia. Además, se ha descrito toxicidad asociada a la terapia: aplasia de linfocitos B que requiere infusiones de inmunoglobulina profiláctica de manera prolongada y probablemente indefinida, síndrome de liberación de citoquinas (CRS) en el 40% de los pacientes y más recientemente, neurotoxicidad grave, en el 20% de los pacientes, en algunos de ellos fatal. A pesar de ello, la US Food and Drug Administration (FDA) ha considerado que estos efectos secundarios son manejables y ha aprobado recientemente dos de estos productos celulares CART19: Kymriah® (tisagenlecleucel), Novartis/Gilead y Yescarta® (Axicabtagene Ciloleucel), Kite Pharma, que han salido al mercado con precios de 475,000 y 373,000 dólares por paciente, respectivamente.

**CAR-NKG2D:** Numerosos estudios preclínicos han demostrado la eficacia antitumoral de los receptores quiméricos antigénicos NKG2D en diferentes tipos de cáncer como linfomas, mieloma múltiple o carcinoma de ovario. Esta eficacia está determinada no sólo por el reconocimiento de ligandos de NKG2D en las células tumorales sino también por el reconocimiento de estos ligandos en las células inmunosupresoras del microambiente tumoral. Esto, unido a la capacidad de promover la producción de citocinas tipo Th1, como IFN- $\gamma$ , G-CSF, TNF- $\alpha$ , y la inhibición de la producción de citocinas Th2 como IL-5, IL-9, IL-10. Este cambio en el perfil de citocinas resulta fundamental para modificar el microambiente tumoral tolerante e inducir inmunidad antitumoral efectiva en el huésped. Estos nuevos CAR-NKG2D han demostrado su eficacia en cánceres de adulto como carcinoma de próstata y en cánceres infantiles, tal y como ha descrito recientemente nuestro grupo, como el sarcoma de Ewing y el osteosarcoma (Fernández L et al. Cancer Letter 2015; Fernández L et al. Clinical Cancer Research 2017). Estudios preliminares de nuestro grupo de investigación además indican un papel relevante de la vía NKG2D-NKG2DL en las leucemias agudas infantiles (Fernández et al. Marsella, European Bone Marrow Transplantation (EBMT) meeting 2017; Pérez- Martínez A et al. Quebec, American Society of Paediatric Haemato-Oncology (ASPHO) 2017). Los blastos leucémicos expresan NKG2DL (Figuras 1A y 1B) y además son susceptibles a la citotoxicidad por linfocitos T de memoria que expresan el NKG2D-CAR (Figura 2). Por lo que estos pacientes podrían beneficiarse de una terapia NKG2D-CAR. Además, hemos observado un papel fundamental de la vía NKG2D-NKG2DL para la eliminación inmune de las células iniciadoras de tumor en osteosarcoma y mieloma múltiple, indicando que la terapia CAR-NKG2D podría estar dirigida específicamente contra la subpoblación de células iniciadoras de la leucemia (Leivas A. Oncoimmunology 2016).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Las leucemias agudas infantiles expresan ligandos para el receptor NKG2D como (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4), lo que los harían potencialmente susceptibles para ser reconocidos por células del sistema inmune, fundamentalmente células NK, a través del receptor NKG2D o por otras células efectoras que no expresan de manera constitutiva el receptor NKG2D pero a los cuales se les puede incorporar un receptor quimérico NKG2D.
2. La expresión del receptor quimérico NKG2D en linfocitos T memoria 45RA<sup>-</sup> podría aumentar y restablecer el efecto anti-leucemia del sistema inmune, equilibrio y eliminación, al mejorar el reconocimiento de los blastos leucémicos por este receptor soslayando las principales limitaciones de los linfocitos T convencionales, la alogenicidad y la ausencia de memoria inmunológica de las células NK.
3. La terapia CART-45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> podría convertirse en una opción terapéutica para la leucemia aguda refractaria en los niños, tal y cómo lo ha hecho CAR-T19 en la LLAB. Nuestra primera hipótesis principal es que la administración de células Gaby, CART-45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> es factible y puede lograrse de forma segura. Nuestra segunda hipótesis es que la supervivencia libre de enfermedad tras la administración del CART-45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> es superior a otros esquemas de rescate tanto de quimioterapia como de inmunoterapia (anticuerpos monoclonales).

## OBJETIVOS GENERALES

1. Desarrollar y validar un método de producción de linfocitos T memoria con el receptor antigénico quimérico NKG2D, CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>, mediante un sistema cerrado de producción celular (CliniMACs Prodigy) para el tratamiento de pacientes pediátricos con leucemia aguda y leucemia mielomonocítica juvenil.
2. Búsqueda de dosis y evaluación de la seguridad del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> a través de un ensayo clínico Fase I.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Optimizar y validar un protocolo de producción celular de linfocitos T de memoria (CD45RA<sup>-</sup>) con lentivirus NKG2D-CAR a escala clínica y en condiciones GMP en el equipo CliniMACs Prodigy para obtener el CART-45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>
2. Evaluación de la seguridad del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> en pacientes con leucemia aguda (LLA-B, LLA-T), LMA y LMMJ en situación de refractariedad o al menos en segunda recaída mediante la realización de un ensayo clínico fase I.
3. Determinar la dosis limitante de toxicidad del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>.

## OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Determinar en el CliniMACs Prodigy el número óptimo de células de partida, la cantidad de virus necesarios por célula (MOI) y el tiempo necesario de expansión para obtener un número suficiente del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> para uso clínico.
2. Verificar mediante citometría de flujo la eficiencia de transducción, la viabilidad, y el porcentaje y la estabilidad de la expresión del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> en los linfocitos T de memoria transducidos en el equipo CliniMACs Prodigy.
3. Constatar la seguridad, estabilidad genética, ausencia de actividad frente a células humanas no tumorales y capacidad anti-leucémica *in vitro* de del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> obtenidas a escala clínica y en condiciones GMP en el equipo CliniMACs Prodigy.
4. Validación del protocolo de producción del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> por parte de la AEMPS y autorización para su uso en humanos en el contexto de un ensayo clínico.
5. Evaluar la eficacia preliminar de la administración del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> a través de la evaluación de la respuesta biológica y clínica.
6. Evaluar la persistencia y función del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> en pacientes con leucemia aguda y leucemia mielomonocítica juvenil.

## **Relevancia científica y práctica de la investigación.**

### **- RESULTADOS ESPERADOS.**

Con los resultados de este proyecto esperamos validar el protocolo de producción del CART-CD45RA<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> a escala clínica y en condiciones GMP en el sistema automatizado CliniMACS Prodigy para obtener la autorización de la Agencia Española del Medicamento y productos sanitarios (AEMPS) para su administración en humanos y solicitar un ensayo clínico fase I.

Con el ensayo clínico fase I esperamos establecer las bases hacia el avance consecutivo de la puesta en marcha de este protocolo de validación en los pacientes pediátricos con leucemia. Así mismo esperamos tener una visión inicial de la eficacia y toxicidad del tratamiento traducida la primera en términos de supervivencia.

### **- UTILIDAD DEL ESTUDIO.**

Tener la posibilidad de acercar de una manera más eficaz al paciente pediátrico con leucemia en situación de refractariedad o en segunda recaída, un tratamiento innovador y esperanzador a través de la validación del sistema CliniMACS Prodigy, el cual podría permitir la reproducibilidad y estandarización del protocolo de producción celular evitando con esto la necesidad de una sala blanca al cumplir dicho sistema con la normativa GMP (Good Manufacturing Practice), suponiendo esto además un ahorro en espacio y mantenimiento y/o personal.

Además es necesario el desarrollo de nuevos CART, además del CART19, ya que éste sólo está siendo beneficioso para pacientes con LLA B que expresen CD19. El resto de leucemias CD19- y las recaídas de las LLAB CD19+ tras CART19 pierden la expresión de este antígeno con lo que resulta ineficaz. Además, la producción del CART19 se utiliza al propio paciente, que en muchas ocasiones, fundamentalmente en la edad pediátrica, no tiene un número apropiado de linfocitos T para poder ser transfectados con el CART.

Nuestro proyecto para esta “V beca unoentrecienmil” es un claro ejemplo de la innovación en Oncología Infantil, la multidisciplinaridad de los equipos y el desarrollo tecnológico desde un Hospital Público, y de sus instituciones académicas de nuestro país. Incluye a un equipo formado por profesionales sanitarios de diferentes especialidades pediátricas (Oncohematología Infantil, Cuidados Intensivos pediátricos) y médicas (Inmunología, Hematología, Farmacología Clínica) junto con investigadores básicos (grupo de investigación CNIO, INGEMM idiPAZ), clínicos (grupo de investigación idiPAZ), traslacionales y expertos en los aspectos regulatorios y en el desarrollo de ensayos clínicos (UCICEC). A nuestro entender modelo hacia dónde deben dirigirse los esfuerzos para acabar durante nuestra carrera profesional con la leucemia infantil.

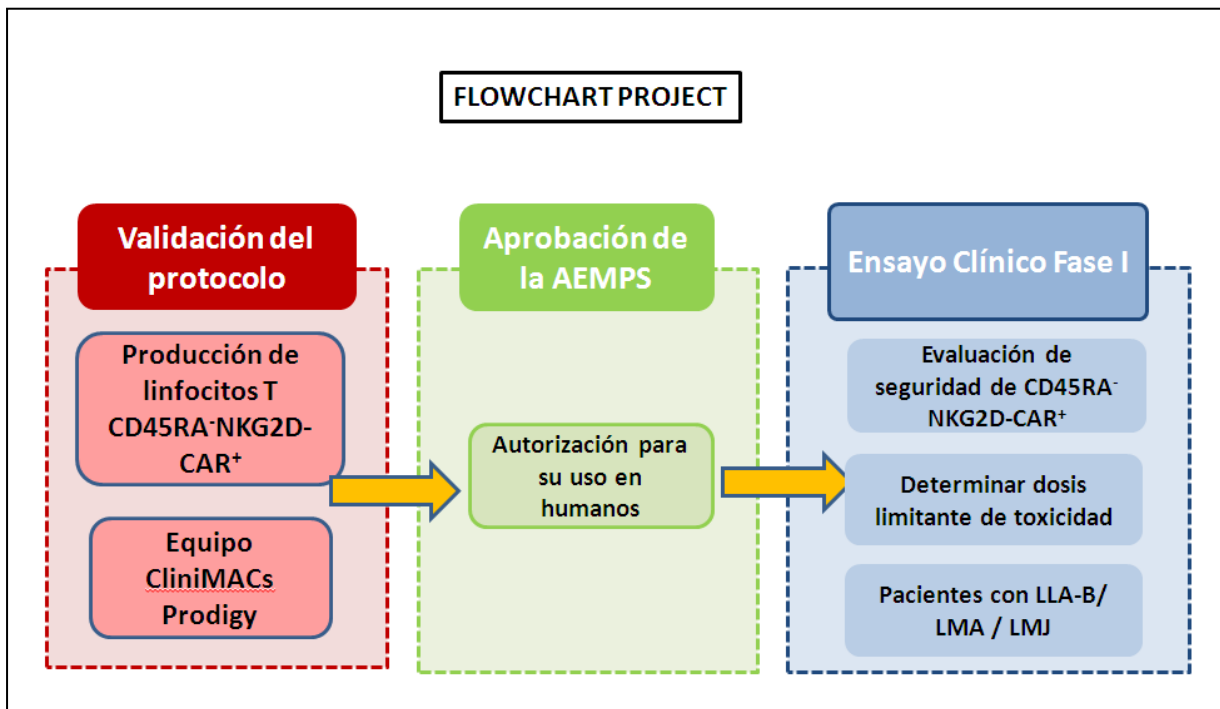


Diagrama de Flujo del Proyecto de investigación.