



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## **Generación de una fuente de linfocitos T alogénicos para su uso en terapia CAR-T contra enfermedades oncológicas e infecciosas**

Mario Vázquez Portero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



Programa de Doctorado en Biomedicina

Línea de investigación en Inmunología

2022-2024



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Generación de una fuente de linfocitos T alogénicos para su uso en terapia CAR-T contra enfermedades oncológicas e infecciosas

Tesis doctoral presentada por:

Mario Vázquez Portero

Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer/Hospital Clínic de  
Barcelona

Departamento de Inmunología, sección de Inmunoteràpia

Doctorando

Mario  
Vázquez Portero

Co-Director

Dr. Hugo  
Calderón

Co-Director y Tutor

Dr. Manel  
Juan Otero

*Als meus pares,  
Mei i Antonio,  
A la meva germana Ari  
I a la Paula*

*Us estimo*

*<<Alça el vol, marxa lluny. I que importa si ningú ho entén?>>  
- Marie Curie*



## Agradecimientos

Las primeras páginas de mi tesis no podían ser sino... ¡de agradecimientos! Acostumbro a ser un poco pesado, ya me conocéis... Espero no alargarme demasiado. ¡Sólo deciros que si aparecéis por aquí es porque os quiero mucho y sois importantes para mí!

Primero de todo, como no podría ser de otra forma, Hugo. Agradecerte toda la ayuda que me has prestado y la confianza. Sin ti no estaría aquí. Eres mi científico favorito, aunque ahora estés enfrascado en menesteres clínicos, espero que algún día puedas volver a ponerte a tope con la investigación, creo que el mundo en general se beneficiaría de ello. Muchas gracias por enseñarme prácticamente todo, rigor científico, curiosidad, aprender a ver las cosas siempre de forma positiva. Lo dicho, para mí siempre serás un ejemplo a seguir, espero que puedas estar orgulloso de que haya sido tu primer *PhD student*. ¡Ojalá pudiese quedarme toda una vida investigando contigo! (Diría que la palabra que más te he escuchado decir en todos estos años es retención, ojalá cambie, vaya peñazo)

Després, Manel (profe), encara no tinc gaire clar com vas deixar que l'Hugo em reclutés per la feina... Però mil gràcies! He pogut aprendre una infinitat de coses. Totes les nostres reunions, encara que no han estat gaires, sempre em feien estar content, espero que a tu també. Tan de bó més gent fos com tú, sempre mirant pels altres i no tant per un mateix. Espero poder endur-me una mica d'aquesta saviesa que tens, moltes gràcies per tots els consells. Vaig arribar sense saber que era un CAR, ara ja mai més podré oblidar-me'n.

Este párrafo, es para ti papa. Muchas gracias por hacerme siempre el camino llano. Por esforzarte en explicarme siempre cosas des de pequeño. Por enseñarme que las cosas hay que hacerlas bien y por ese amor incondicional que tienes hacia mí. Has sido un ejemplo a seguir en prácticamente todo. Gracias por todos los paseos en bicicleta, por enseñarme a amar la naturaleza y el mundo que nos rodea. Si estoy aquí hoy, es gracias a ti, este “triumfo” es de los dos a partes iguales. Seguiré esforzándome siempre para hacerte sentir orgulloso.

África i Lea, us estimo, sou la llum de la meva vida, les vostres abraçades curen.

Tata, no tengo palabras. Literalmente, sin ti no estaría aquí. Gracias por cuidarme desde pequeño, has sido mi referente durante toda mi vida, tanto, que he acabado siguiendo tus pasos. Espero poder seguirlos aún más en el futuro. Te quiero.

A mi familia postiza, Elsa, Vicente Cèlia, gracias por acogerme como uno más!

Als meus amics de tota la vida, i alguns de no tota. Jenaro, Marc, Víctor, Pablo, Pilar no recordo quan temps fa que us conec, moltes gràcies per ser els meus amics, per tots els riures, per totes les nostres cafrades, per tot el suport incessant. Ara ja podré deixar de parlar de la tesi ejejej, a veure amb que us dono la tabarra a partir d'ara.

Als meus Razz! David, Luís y Marc sou una inspiració, m'ompliu el cor quan quedem. Un cop acabada la tesi podríem tornar a celebrar a lo grande, un concertillu de Oques Grasses o un Razzmatazz tonto segur que cae. Quan vaig escriure això el Marc encara no estava al Japó JAJAJAJA en fin, la vida.

A tot el grup de f·r·i·e·n·d·s, per les excursions infinites, per els plans de vacances, les calçotades, els horrolands, cap d'anys, els mil i un aniversaris que celebren a l'any (hola?). Us estimo, sou una part importantíssima de la meva vida!

Mil gràcies als meus bastoneris, Sabina, Inés, Aniol, els dimarts, ara els dijous, fotent garrotades amb vosaltres i pillant cervera dels avis han estat increïbles!

A les meves amigues de la uni, la Júlia i la Nat, com podria oblidar-me de vosaltres després de tantes hores de la RENFE, maleïda UAB, maleït R8. Sense vosaltres no hagués estat capaç d'acabar bioquímica. A les amigues del màster, la Paula i la Mel, quin any tan intens, covid, covid. Però que bé m'ho vaig passar amb vosaltres fent videotrucades! A totes quatre, he après moltíssimes coses de vosaltres.

A part, Mel, m'ha donat per escriure això avui, no se qui acabarà abans la tesi, però espero que poguem demanar algún projecte junts (no sé si el món estarà preparat pero que hi farem).

També volia agrair al meu grup del màster! Moltes gracias Meri, Paola i Carlos. No vaig poder estar gaire temps amb vosaltres per culpa de la covid, pero vaig gaudir cada segon. Sempre em quedarà l'espina clavada de no a ver pogut fer la tesi al lab. Moltes gràcies per seguir preocupant-vos per mi després de tants anys!

Adán, amigo, esto no es un juego. No se en que momento la vida nos brindó la oportunidad de trabajar juntos, pero vaya máquinas. Muchas gracias por las charlas escondiéndonos de los jefes, me ayudaron a salir del pozo cuando menos claro veía las cosas. ¡También gracias a ti Alba! Cómo le cuento yo a alguien que era feliz analizando agua de alcantarillas...

Then, Mike! Thank you, a lot, for caring all this time! I learned many things from you, but nothing compares to the shitty experiments. I think as for today I have enough shitty experiments to write a shitty thesis. Really lots of fun, much appreciated!

Ara, paso als meus Companys de laboratorio. En general, guau! Heu aconseguit aguantarme 3 anys. Disculpeu la meva hiperactivitat diària, i les ganes de empipar que he tingut sempre. Espero que hàgiu pogut gaudir de mi una mica. Bé, pasem llista:

Als meus compis de la planta dos, vaig començar amb vosaltres, i he acabat un pis més abaix, bueno... es lo que hay. Moltes gràcies pels plans i fer petar la xerrada!

Bertukins, mi compilab. El primer cop que vam parlar va ser per enviar mostres a seqüenciar a la Xina (t'en recordes?). Hem anat fent camí plegats, i la veritat es que ho hem gaudit com uns malparits (ehem Munich, cerveza, pretzl). Perdò per desconcentrar-te tota la estona, per escoltar totes les meves parides, pel safareig a cultius. Anda que no hemos rajao jajajajja. Ets una científica excelent, acaba aviat t'estarà esperant a l'altra banda del PhD per tot el que necessitis!

Gaby! Amiga mía, como me he reído contigo todos estos años. Ojalá hubieses estado en el CEK y no en el BST. Gracias por todo el chocolate de Guate. Por quedar conmigo por las tardes, por invitarme a helado. A los linfocitos T no sé, pero a mí me has rejuvenecido!

Mercedes, gràcies pels alfajores, m'han fet sobreviure any rere any. Cada 12 de març seguiré venint a menjar-ne. T'estimo moltíssim, he rigut moltíssim amb tu, m'ho he passat genial aprenent coses amb tu, mi okupa cabina preferida. Ara que llegeixies això ves preparant el kilo que em vas prometre per el dia de la defensa de la tesi!

Lorenita! Ets un amor de persona, ets la veritable CARTalan dream. Moltes gràcies per ajudar-me en cadascun dels passos de la tesi, per tenir sempre un minut per parlar amb mi de mil i una coses. Per totes les abraçades!

Maria, no trobaré ningú millor per fer lorito! Igual que la Lorena, m'has ajudat un munt. No podria parar d'agrar-te en tota una vida. Sou les meves post-docs preferides!

Sergi, Cris, Ari ha estat una fantasia compartir grup amb vosaltres. Sergi, gràcies per estar a les 7 del matí... i a les 7 de la tarda, per fer sempre petar la xerrada i seguir-me sempre en totes les bromes. Cris, ets una persona genial! No saps quant m'he rigut amb tu, mil gracias per les xerrades de videojocs. Ari, ets l'ànima de la festa. Encara no soc capaç d'entendre com podies saber tants cotis. Gràcies per escoltar-me quan ho

he necessitat, per les estonetes a cultius. Escric això que encara esteu els tres al lab, però jo diria que marxareu abans no presenti la meva tesi... No sabeu quant us trobaré a faltar!

A la resta del grup, Joan (mi pequeño padawan), Valeria, Berto, Alejandro, Andrea, Erik, Blanca, Ane, Iñaki, Alexis, Mireia, Nela, Kike, Canaleta, Roberto, Azu, Natalia moltes gràcies per tot! M'heu fet la vida més fàcil cada dia, us portaré sempre amb mi!

A part, Sergio no m'havia oblidat de tu! He tingut massa sort coneixent algú com tu, moltes gràcies per ser el meu amic desde el principi de la aventura. Tot ha estat més fàcil gràcies a tu. Ets un científic de cap a peus. Moltes gràcies, per tots els buffys que m'has fet, pels matins dels divendres fent pases de cèl·lules amb el reggeaton a tope, per les netejes del -80, la cabina,el incubador... per les contaminacions (ah no, eso no!), per les nostres xerrades. Sigo pensando que prefiero una gallina cada dia a un gorila con espada. De veritat, ets una persona excepcional no canviis mai.

Acabant!

Gràcies Paula! M'has aguantat en el dia a dia, tot i que soc un pesat. M'omples el cor de felicitat des de primera fins a última hora del dia. No escriure gaire perquè ja saps que t'estimo d'aquí a l'infinit! You are my lobster, carinyu!

No podía olvidarme de mis abuelos. Juana, Miguel, Carmen. Gracias por cuidarme cada una de las tardes al salir del colegio. Por llenarme de cariño. Por todos los esfuerzos que habéis hecho. Os llevó siempre en el corazón. Al abuelito Paco, este año estamos de celebración! Por primera vez alguien de la familia llega a los 100 años, y alguien consigue el título de doctor. No sé si son gestas comparables, pero estoy muy orgulloso de que estes aquí para vivirlo conmigo

Finalment, moltes gràcies mama, t'estimo. Com m'agradaria que poguessis estar aquí. Menjo bé, sóc feliç, intento portar-me bé amb tothom, seguint tots els consells que m'has donat. Espero que puguis estar orgullós de mí!



# Índice

Índice de figuras .....	14
Índice de tablas .....	16
Abreviaturas .....	17
Introducción .....	21
<b>1.-SARS-CoV-2 .....</b>	<b>24</b>
1.1.-Genoma .....	24
1.2.-Ciclo infeccioso del virus .....	25
1.3.- Respuesta inmune y patofisiología a la infección por SARS-CoV-2 .....	27
1.4.-Vacunación y protección frente a COVID-19 severo .....	29
1.5.- Terapias frente a la COVID-19.....	30
1.5.1.- Terapias celulares para la COVID-19 .....	30
<b>2.-Terapia con receptores de antígenos quiméricos .....</b>	<b>31</b>
2.1.-Origen de los receptores de antígenos quiméricos.....	31
2.2.-Componentes de los CAR .....	32
2.3.-Evolución de los CAR a lo largo del tiempo.....	33
2.4.-Limitaciones actuales de la terapia CAR-T.....	35
<b>3.-Generación de linfocitos CAR-T alogénicos .....</b>	<b>38</b>
3.1.-Respuesta alogénica y alorecocimiento .....	40
3.2.- Patofisiología y mecanismos moleculares de la respuesta alogénica .....	42
3.3.-Estrategias para evitar la aparición de GvHD .....	47
3.3.1.- Células <i>Natural Killer</i> .....	47
3.3.2.- Linfocitos T $\gamma\delta$ .....	48
3.3.3.-Linfocitos T específicos para virus (VST) .....	49
3.3.4.- Subpoblaciones de linfocitos T de memoria.....	49
3.3.5.- Células CAR-T derivadas de iPSC .....	50
3.3.6.-Linfocitos T $\alpha\beta$ modificados genéticamente.....	51
3.3.6.1.- Estrategias de silenciamiento .....	51
3.3.6.2.- Estrategias de edición génica .....	53
3.3.6.2.1.-Limitaciones e inconvenientes de las tecnologías de edición génica.....	57
3.3.6.3.- Estrategias de retención de proteínas.....	59

<b>3.4.-Estrategias para evitar el rechazo alógeno</b> .....	<b>60</b>
3.4.1.-Uso de tecnologías de silenciamiento o edición génica .....	61
3.4.2.-Depleción del sistema inmune del paciente .....	62
3.4.3.-Uso de inmunoevasinas virales .....	62
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>64</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>69</b>
1.-PCR y electroforesis en gel de agarosa .....	70
2.-Lineas celulares .....	71
3.-Diseño y producción de plásmidos de interés .....	71
4.- Producción de vectores lentivirales de 3ª generación .....	74
5.-Titulación vectores lentivirales .....	76
6.-Aislamiento de linfocitos T .....	76
7.-Expansión de linfocitos T modificados genéticamente .....	77
8.-Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) .....	78
9.-Aislamiento de células NK .....	79
10.-Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i> por luminiscencia .....	79
11.-Ensayos de citotoxicidad por impedancia .....	80
12.-Cuantificación de citocinas y proteínas solubles .....	80
13.-Citometría de flujo .....	81
14.-Purificación de linfocitos T CD3 <sup>low/-</sup> .....	84
15.-Ensayos de citotoxicidad consecutiva .....	84
16.-Ensayos de aloreactividad .....	84
17.-Ensayos de alogenicidad .....	85
18.-Ensayos de degranulación .....	85
19.-Ensayos <i>in vivo</i> .....	85
20.-Ensayos de citotoxicidad con infección de SARS-CoV-2 .....	86
21.- Análisis estadístico .....	86
<b>Resultados</b> .....	<b>88</b>
1.- Desarrollo de un nuevo motivo de retención que permita la disminución en superficie de CD3 y moléculas de HLA-I .....	89
1.1-Secuenciación del hibridoma 33-2A3 dirigido contra CD3ε .....	89
1.2-Efecto de la expresión de inmunoevasinas virales en linfocitos T humanos.....	90

<b>1.3-Efecto de la proteína quimérica CD3US6 en linfocitos T humanos .....</b>	<b>92</b>
<b>1.4-Retención de CD7 a través del intracuerpo CD7US6.....</b>	<b>95</b>
<b>1.5-Efecto de la expresión de CD3US6 sobre el fenotipo de los linfocitos T .....</b>	<b>96</b>
<b>1.6.- Evaluación de la eficacia de CD3US6 para disminuir la respuesta alogénica .....</b>	<b>98</b>
<b>1.6.1.-Evaluación de la reducción de HLA-I sobre el rechazo inmunológico .....</b>	<b>98</b>
<b>1.6.2.-Reconocimiento por parte de las células NK hacia los linfocitos CD3US6....</b>	<b>100</b>
<b>1.6.3.-Determinación del efecto de CD3US6 sobre el GvHD <i>in vitro</i> .....</b>	<b>102</b>
<b>1.6.4.-Estudio del GvHD en un modelo murino .....</b>	<b>104</b>
<b>1.7. Combinación de CD3US6 con un CAR-T de segunda generación .....</b>	<b>106</b>
<b>2.- Desarrollo de una terapia CAR-T dirigida a SARS-CoV-2 .....</b>	<b>112</b>
<b>2.1.-Diseño de CAR de segunda generación contra la proteína S del SARS-CoV-2.....</b>	<b>112</b>
<b>2.2.-Generación de una línea celular modelo infección de SARS-CoV-2.....</b>	<b>114</b>
<b>2.3.-Evaluando la capacidad funcional de los CAR-T contra SARS-CoV-2 .....</b>	<b>115</b>
<b>2.4.- Citotoxicidad en presencia de fármacos inmunosupresores .....</b>	<b>120</b>
<b>2.5.-Evaluando la capacidad citotóxica en un modelo de infección real.....</b>	<b>122</b>
<b>2.6.-Diseño y combinación de CD3US6 con el CAR contra SARS-CoV-2.....</b>	<b>123</b>
<b>2.7.-Evaluando capacidad citotóxica de los CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2.....</b>	<b>126</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>127</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>139</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>143</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Organización genómica y estructural del SARS-CoV-2. ....	25
<b>Figura 2</b> Ciclo infectivo y replicativo del virus. ....	27
<b>Figura 3</b> Gráfico que muestra la evolución natural de la enfermedad de la COVID-19 en casos severos .....	29
<b>Figura 4</b> Representación esquemática de la estructura proteica de las diferentes generaciones de moléculas CAR. ....	34
<b>Figura 5</b> Representación esquemática de las principales limitaciones de la terapia CAR-T. ...	38
<b>Figura 6</b> Representación esquemática del aloreconocimiento a nivel molecular.....	43
<b>Figura 7</b> Representación esquemática de mecanismo patofisiológico del aGvHD por fases ..	45
<b>Figura 8</b> Representación esquemática de las principales fuentes de linfocitos para realizar una terapia CAR de forma alogénica.....	47
<b>Figura 9</b> Representación esquemática del proceso de silenciamiento a través de RNA de interferencia.....	52
<b>Figura 10</b> Representación esquemática de las principales tecnologías utilizadas para mediar edición génica en linfocitos T.....	55
<b>Figura 11</b> Representación esquemática de la estrategia de retención de CD3ε en el Reticulo Endoplasmático mediada por un intracuerpo. ....	60
<b>Figura 12</b> Representación esquemática de los principales mecanismos de reconocimiento por parte de las células NK .....	61
<b>Figura 13</b> Representación esquemática del efecto de diferentes inmunoevasinas sobre la presentación antigénica a nivel molecular .....	63
<b>Figura 14</b> Secuenciación de las regiones variables del anticuerpo 33A-33 contra CD3ε.....	90
<b>Figura 15</b> Expresión de diferentes inmunoevasinas en linfocitos T humanos. ....	91
<b>Figura 16</b> Estudio de la proteína quimérica CD3US6.....	94
<b>Figura 17</b> Retención de la proteína CD7 .....	95
<b>Figura 18</b> Efecto de la expresión de CD3US6 sobre el fenotipo de los linfocitos T. ....	97
<b>Figura 19</b> Efecto de la reducción de HLA-I sobre el rechazo inmunológico .....	99
<b>Figura 20</b> Reconocimiento por parte de las células NK hacia los linfocitos CD3US6. ....	101

<b>Figura 21</b> Determinación del efecto de CD3US6 sobre el aloreconocimiento .....	103
<b>Figura 22</b> Estudio de la aloreactividad en un modelo murino .....	104
<b>Figura 23</b> Curva de supervivencia de los dos grupos experimentales .....	105
<b>Figura 24</b> Análisis de la infiltración de linfocitos T en órganos murinos .....	106
<b>Figura 25</b> Combinación de CD3US6 con un CAR-T de segunda generación .....	107
<b>Figura 26</b> Estudio funcional de los linfocitos ARI-0002hU.....	109
<b>Figura 27</b> Determinación de la funcionalidad de los linfocitos ARI-0002hU en un modelo murino .....	111
<b>Figura 28</b> Diseño de CAR de segunda generación contra la proteína S del SARS-CoV-2 .....	113
<b>Figura 29</b> Generación de un modelo de infección <i>in vitro</i> . .....	115
<b>Figura 30</b> Evaluación funcional de los linfocitos CAR-T contra SARS-CoV-2 .....	116
<b>Figura 31</b> Evaluación de la especificidad de los linfocitos CAR-T contra SARS-CoV-2 .....	117
<b>Figura 32</b> Determinación de la persistencia <i>in vitro</i> .....	119
<b>Figura 33</b> Citotoxicidad en presencia de fármacos inmunosupresores. ....	121
<b>Figura 34</b> Evaluando la capacidad funcional de los linfocitos CAR-T en un modelo de infección real.....	123
<b>Figura 35</b> Generación de linfocitos CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2 .....	125
<b>Figura 36</b> Evaluación funcional de los linfocitos CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2. ....	127

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Tabla comparativa sobre las principales características de la producción de terapias CAR-T de forma autóloga o alogénica .....	40
<b>Tabla 2</b> Clasificación de la severidad de las manifestaciones clínicas asociadas al aGvHD. ..	46
<b>Tabla 3</b> Escala de gradación del aGvHD en base a las manifestaciones clínicas.....	46

## **Abreviaturas**

### **A**

ACE2: Enzima convertidora de la angiotensina 2

AG: Aparato de Golgi

APC: Células presentadoras de antígeno

ARDS: Síndrome agudo de dificultad respiratoria

ATCC: American Tissue Culture Collection

### **B**

BCMA: Antígeno de maduración de las células B

### **C**

CAR: Receptor de antígeno quimérico

CD: Cluster de diferenciación

CIITA: Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

CRISPR: Clustered regularly interspaced palindromic repeats

CRS: Síndrome de liberación de citocinas

CTFR: Cell Trace Far Red

CTLA-4: Antígeno de linfocitos T citotóxicos 4

### **D**

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DC: Células dendríticas

DMEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium

DNA : ácido desoxirribonucleico

DSB: Rotura de doble cadena

## **E**

EF-1 $\alpha$ : Factor de Elongación 1 $\alpha$

ELISA: Ensayo de enzimoimmunoanálisis de adsorción

Erd: Receptor de proteínas retenidas en el lumen del RE

## **F**

FBS: Suero Fetal Bovino

## **G**

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GvHD: Enfermedad injerto contra receptor

## **H**

HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad

## **I**

IFN: Interferón

IL: Interleucina

Ig: Inmunoglobulina

iPSC: Célula madre pluripotente inducida

ITAM: Motivos de activación del inmunoreceptor de tirosina

## **J**

JAK: Quinasas Janus

## **L**

LB: Luria's Broth

## **M**

moDC: Células Dendríticas derivadas de monocitos

MOI: multiplicidad de infección

mRNA: RNA mensajero

## **N**

NHEJ: Unión de extremos no homólogos

NK: Natural killer

## **O**

ORF: Open reading frames

## **P**

PAM: Protospacer adjacent motif

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMCs: Células polimorfonucleares de la sangre

PBS: Tampón fosfato Salino

PFA: Paraformaldehído

PD-1: Proteína de muerte celular programada

PEI: Polietilenamina

PoliA: poliadenina

Pri-miRNA: Micro RNA primario

## **R**

RE: Retículo Endoplasmático

RISC: Complejo de silenciamiento por RNA

RNP: Ribonucleoproteína

RNA: Ácido ribonucleico

RTC: Complejos de replicación-trascripción

## **S**

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SDSA: Síntesi de DNA dependiente de recocido

ScFv: Single chain variable fragment

sgRNA: single guide RNA

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción

## **T**

TAL: Transcription activator-like

TALEN: Nucleasas efectoras transcription activator-like

TAE: Tris/Ácido Acético / EDTA

TCR: Receptor de células T

TNFR: Receptores del factor de necrosis tumoral

TMPRSS2: Proteasa de transembranasa de serina 2

Treg: T reguladoras

tracrRNA: RNA transactivador de CRISPR

## **U**

UTR: Regiones no traducidas

## **V**

VH: Cadena variable pesada

VL: Cadena variable ligera

VST: Linfocitos específicos para virus

## **X**

XvHD: Enfermedad xenoinjerto contra receptor

## **Z**

ZFN: Nucleasas zinc finger

# Introducción



El sistema inmunitario es el encargado de la defensa contra agentes patógenos y el cáncer. Este sistema está formado por diferentes células que se relacionan entre sí a través de una compleja red de señales moleculares.

Dentro del sistema inmunitario, podemos distinguir dos ramas. Por una parte, encontramos la inmunidad innata, que es la primera línea de defensa, encargada de detectar y contener la propagación de amenazas. Por otra parte, encontramos la inmunidad adaptativa, la cual es una respuesta secundaria dependiente de la inmunidad innata, pero que presenta un alto grado de especificidad.

En un contexto de infección, los componentes de la inmunidad innata se encargarán de contener al agente infeccioso para evitar su diseminación. Además, esta respuesta innata es capaz de mediar la activación de la inmunidad adaptativa, la cual se caracteriza por generar memoria inmunológica, pudiendo responder de forma más eficiente frente a una segunda exposición del mismo agente infeccioso<sup>1</sup>.

En las últimas décadas, se ha generado una corriente de estudio conocida como inmunoterapia, basada en aplicar el conocimiento existente sobre el sistema inmunitario para intentar mejorar su respuesta frente a infecciones o el cáncer. Dentro de la inmunoterapia, encontramos diferentes ramas o estrategias, como el uso de anticuerpos monoclonales, los denominados *immune checkpoint inhibitors* o las vacunas para cáncer. En esta tesis doctoral nos centraremos en concreto en la rama de la inmunoterapia celular, que utiliza células del sistema inmunitario para tratar pacientes. En los últimos años, la combinación de la inmunoterapia celular con la terapia génica ha dado lugar a la aparición de innumerables estrategias terapéuticas, destacando las terapias basadas en los receptores de antígenos quiméricos (CAR)<sup>2</sup>.

A lo largo de esta introducción entraremos en detalle en los temas referentes a la infección por el *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) y la respuesta inmunitaria durante la infección por este virus, así como aspectos relacionados con la protección y el tratamiento frente a este. Además, en una segunda parte de esta introducción, nos centraremos en las terapias CAR-T, explicando su origen, desarrollo y los principales inconvenientes que presentan en la actualidad, centrándonos sobre todo en lo referente a la accesibilidad y disponibilidad de este tipo de terapia, para acabar explicando la posibilidad de generar este tipo de terapia de forma alogénica, mediante el uso de células de donantes, comentando las ventajas e inconvenientes de esta aproximación, así como de las principales estrategias para llevarla a cabo.

## 1.-SARS-CoV-2

A finales del 2019, se describió en China el brote de un nuevo virus, el SARS-CoV-2, que es el agente causante de la enfermedad conocida como COVID-19 (*del inglés COronavirus Disease 2019*). Este brote dio lugar a una pandemia con grandes consecuencias a nivel global en ámbitos económicos, sociales, políticos y sobre todo de salud. En el 2023 se dio por finalizada habiendo dejado registradas un total de más de 7 millones de muertes<sup>3-5</sup>.

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los *coronaviridae* y se clasifica dentro del género de los *betacoronavirus*. Los virus pertenecientes a este género pueden infectar diferentes especies de mamíferos, entre los cuales se encuentran los humanos.

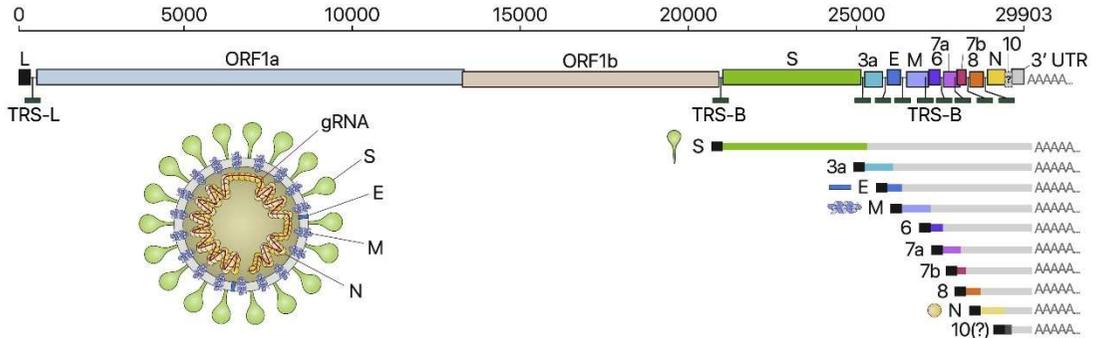
Los *betacoronavirus* se caracterizan por tener un genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla con polaridad positiva de entre 26-32kilobases. Estos presentan una envuelta lipídica que contiene la proteína de la espícula, o proteína S, la cual confiere a las partículas víricas su reconocida forma de *corona*<sup>6</sup>.

### 1.1.-Genoma

Los estudios filogenéticos realizados sobre el SARS-CoV-2 lo sitúan dentro de la especie de coronavirus relacionados con SARS, teniendo un alto grado de similitud al SARS-CoV-1.<sup>7</sup>

El genoma de los coronavirus se caracteriza por la presencia de dos regiones no traducidas (UTR), en los extremos 5' y 3' del genoma del virus, que se corresponden con una estructura 5'cap y una cola de poliadenina (poliA) respectivamente.<sup>8,9</sup> La organización genómica del SARS-CoV-2 es muy similar a la de otros *betacoronavirus*, habiéndose descrito 12 *open reading frames* (ORF), que codifican para las poliproteínas ORF1a y ORF1b, además de para las proteínas estructurales S, 3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N y 10 (**Figura 1**)<sup>10</sup>.

Además, como es característico del orden de los *Nidovirales*, la transcripción del genoma da lugar a RNA subgenómicos, a través de la interacción de las secuencias reguladoras de la transcripción TRS-L y TRS-B. Estos RNA subgenómicos comparten la misma secuencia 5'UTR, pero su región codificante y 3'UTR es diferente entre ellos. Es a partir de estos que se da la traducción de las diferentes proteínas codificadas en el genoma del virus<sup>11,12</sup>.



**Figura 1 Organización genómica y estructural del SARS-CoV-2.** En la figura se puede apreciar la organización de los diferentes genes codificados en el genoma del virus, como los ORF, o bien las diferentes proteínas estructurales. Además, también se pueden apreciar los diferentes RNA subgenómicos del virus. Extraído de: Kim, Dongwan et al., 2020

## 1.2.-Ciclo infectivo del virus

Los coronavirus tienen un ciclo lítico (**Figura 2**). El inicio de este ciclo se da con la entrada del virus a la célula. En el caso del SARS-CoV-2, la principal proteína implicada en la entrada a la célula es la proteína S, un homotrímero. Dentro de estas proteínas, encontramos las subunidades S1 y S2 que juegan un papel clave en diferentes pasos del proceso de entrada del virus a la célula.

Se han descrito dos vías de entrada principales, la vía de entrada a través de la membrana celular y la vía de entrada a través de endosomas. Ambas se inician a través de la interacción de la proteína S con su receptor, la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2), expresada sobre todo en las células del epitelio pulmonar, concretamente en las células alveolares de tipo II.<sup>13</sup>

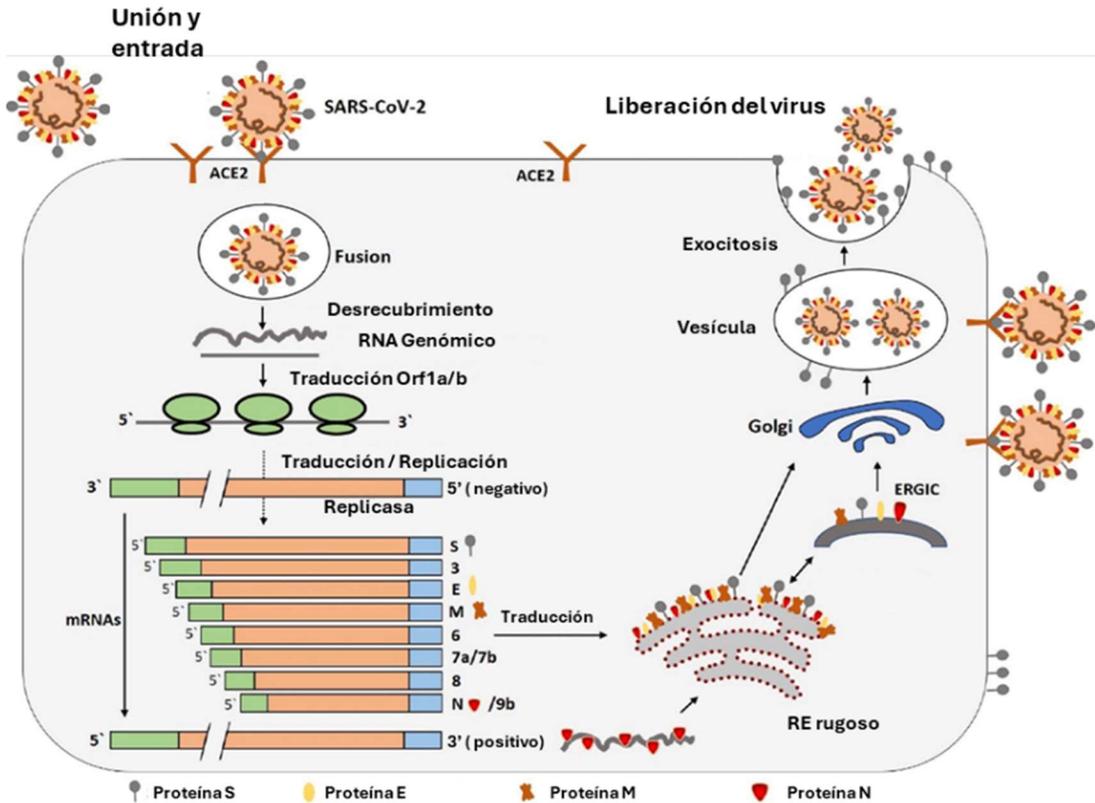
En un primer momento, la proteína S del virus puede variar entre dos conformaciones, en función de la estructura de su dominio de unión al receptor (RBD) conocidas como RBD *down* y RBD *up*. En la conformación RBD *up*, la proteína puede interactuar con el receptor ACE2. Esta interacción deja al descubierto el sitio de corte S2'. A partir de esta interacción, el virus puede entrar a través de la vía de entrada a través la superficie celular o a través de una vía endosomal secundaria.

En la vía de la superficie celular, esta región S2' puede ser reconocida por la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2). En la vía endosomal, la interacción de virus con la célula activa el transporte retrogrado dependiente de clatrina. A través de esta vía, llega a los endosomas de la célula, donde la Cathepsina L podrá mediar el corte de la región S2'. El corte mediado por cualquiera de estas dos proteasas inducirá un cambio

conformacional en la proteína S del virus que permitirá la inserción del péptido de fusión en la membrana del endosoma o la membrana celular. Posteriormente, un nuevo cambio conformacional en la subunidad S2 generará un poro de fusión que permitirá el acceso del genoma del virus al citoplasma celular<sup>14</sup>.

Una vez el genoma del virus alcanza el citoplasma se inicia la fase de replicación. En un primer momento, el genoma vírico es capaz de secuestrar los ribosomas de la célula infectada para expresar las poliproteínas pp1a y pp1ab, codificadas por los ORF1a y ORF1b respectivamente. La expresión de estos polipéptidos da lugar a las diferentes proteínas no estructurales, que se encargarán de interferir con la expresión de los mRNA de la célula y formar los complejos de replicación-transcripción (RTC). La formación de los RTC promueve la síntesis de la cadena negativa del genoma vírico, que se utilizará como molde para la replicación genómica o para la transcripción de los RNA subgenómicos, a partir de los cuales se expresarán las diferentes proteínas estructurales y accesorias que servirán para formar nuevos viriones<sup>15,16</sup>.

De entre estas proteínas estructurales, las proteínas S, M y E se introducirán en el Retículo Endoplasmático (RE) a través de un proceso de gemación y serán translocadas al compartimento intermedio entre el RE y el Aparato de Golgi (AG) (ERGIC), donde generarán la envuelta del virión. Al mismo tiempo, la proteína N, que forma la nucleocápside, se ensamblará en el citosol junto al genoma del virus para formar la ribonucleoproteína (RNP). Esta RNP entrará en contacto con la estructura de la envuelta en el ERGIC, formando un nuevo virión. Finalmente, el virión será liberado al espacio extracelular a través de la vía lisosomal<sup>17-19</sup>.



**Figura 2 Ciclo infeccioso y replicativo del virus.** La entrada del virus a la célula se da a través de la interacción de la proteína S del virus con el receptor ACE2. Una vez mediada esta interacción, se produce la fusión de membranas y el genoma del virus se libera en el citosol. A partir del RNA genómico, se da la traducción y la replicación de las proteínas del virus. Finalmente, las diferentes proteínas estructurales se ensamblan en el RE, para finalmente, formar nuevos viriones que se liberaran al espacio extracelular. Extraído de: MA Sheereen et al., 2020

### 1.3.- Respuesta inmune y patofisiología a la infección por SARS-CoV-2

La infección de las células del epitelio pulmonar por parte del virus genera un efecto citopático sobre estas. Al lisarse, las células infectadas liberan al medio extracelular diferentes componentes como alarminas, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que son reconocidos por los componentes del sistema inmune innato. La activación del sistema inmune innato implica la generación de una inflamación local en la zona de infección, así como la maduración de las células dendríticas (DCs) del tejido. Esta inflamación mediada por la inmunidad innata es capaz de mediar la activación posterior de los componentes del sistema inmune adaptativo y reclutarlos al sitio de infección para intentar mediar la eliminación del virus.

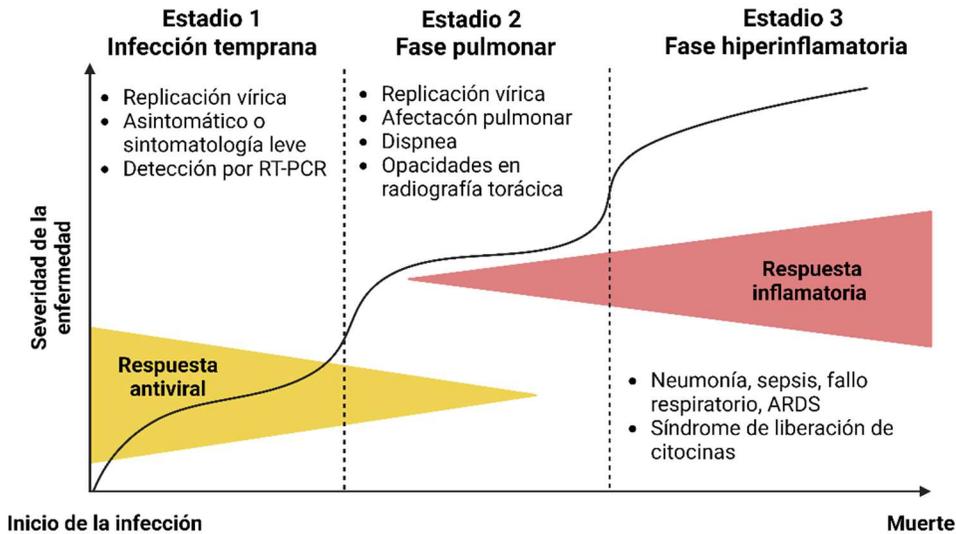
Una vez reclutado el sistema inmune adaptativo, pueden ocurrir dos escenarios. Si la respuesta inmune está bien orquestada, se mediará la lisis de las células infectadas, la neutralización de las partículas víricas y la fagocitosis y eliminación de células apoptóticas, con una inflamación moderada. Por el contrario, se puede dar un escenario en que la respuesta inmune no es capaz de eliminar rápidamente el virus, produciéndose una infiltración excesiva de los componentes del sistema inmunitario, llevando a una respuesta exacerbada con un alto grado de inflamación en el parénquima pulmonar y a un síndrome de liberación de citocinas (CRS) que pueda producir daños también a nivel sistémico<sup>20</sup>.

Se ha propuesto que el curso natural de la infección por COVID-19 podría dividirse en 3 estadios diferenciados, con una severidad creciente en la sintomatología si la infección no logra resolverse (**Figura 3**):

- Primer estadio: Infección temprana donde no hay sintomatología o esta es muy leve (fiebre y tos).
- Segundo estadio: Afectación pulmonar que puede cursar con algunos síntomas como disnea o neumonía.
- Tercer estadio: Hiperinflamación, la sintomatología es mucho más severa, cursando con síndrome agudo de dificultad respiratoria (ARDS), sepsis o CRS<sup>21</sup>.

Debido a la alta expresión del receptor ACE2 en el sistema respiratorio, la mayoría de la sintomatología está asociada al daño en este tejido. Los principales estudios histopatológicos han descrito que el daño en el tejido pulmonar en los casos más severos se corresponde con un patrón de daño alveolar difuso, el cual puede dar lugar a ARDS.<sup>22</sup> Debido al daño provocado en el epitelio alveolar, se ha descrito una disminución de la fibrinólisis. Esto implica cambios en el tejido alveolar que dificultan el intercambio de gases, generando hipoxia. Además, debido a la activación de la coagulación, donde juegan un papel clave las plaquetas y los neutrófilos, también se da la aparición de trombos fibróticos que pueden generar coagulopatías<sup>23</sup>.

Debido al daño tisular y a la inflamación hay una alta infiltración inmune en el tejido, principalmente compuesta por monocitos y macrófagos, con un patrón de activación que produce una desregulación inflamatoria que limita la función de los linfocitos T. Se ha descrito que, en un gran porcentaje de los casos, una infiltración de linfocitos T se asocia a una mejor prognosis y recuperación en aquellos individuos con un COVID-19 severo<sup>24-26</sup>.



**Figura 3** Gráfico que muestra la evolución natural de la enfermedad de la COVID-19 en casos severos. Extraído de: Dos Santos WG,2020

#### 1.4.-Vacunación y protección frente a COVID-19 severo

A partir de la introducción de diversas vacunas durante la pandemia de la COVID-19, se ha logrado una alta tasa de inmunización, protegiendo a prácticamente la totalidad de los individuos de los cuadros clínicos más severos<sup>27,28</sup>. Sin embargo, se han definido ciertos grupos de la población que presentan una menor tasa de inmunización y que siguen teniendo un riesgo más elevado de padecer síntomas graves. Estos grupos incluyen principalmente a individuos que han recibido un trasplante de órgano sólido<sup>29-34</sup> e individuos que padecen ciertos tipos de cáncer, especialmente hematológicos<sup>35-38</sup>. La afectación sobre el sistema inmunitario en estos individuos impide que generen una respuesta adecuada a través de la vacunación. Aunque algunos estudios sugieren que el uso de múltiples dosis de recuerdo puede incrementar la tasa de inmunización en estos grupos<sup>29,39</sup>, es necesario desarrollar terapias adicionales que puedan ayudar a combatir la infección en estas poblaciones de riesgo.

## 1.5.- Terapias frente a la COVID-19

Durante la primera fase de la pandemia, la falta de opciones terapéuticas eficaces para tratar la COVID-19 llevó a la aprobación de diversos medicamentos que podían tener un efecto beneficioso sobre la enfermedad en base a resultados obtenidos *in vitro*, o a la eficacia demostrada para el tratamiento de otras enfermedades infecciosas. Sin embargo, muchos de estos medicamentos (hidroxicloroquina, lopinavir-ritonavir, ivermectin) no mostraron un beneficio clínico significativo en los ensayos clínicos llevados a cabo<sup>40</sup>.

Solo unas pocas terapias han demostrado un efecto beneficioso. Por ejemplo, el uso del Redemisvir ha mostrado eficacia a la hora de reducir el tiempo de recuperación en pacientes, siendo el único fármaco antiviral aprobado para el tratamiento de la COVID-19<sup>41,42</sup>. Otros antivirales como el Molnupiravir o el Nirmatrelvir han recibido una aprobación de urgencia debido a su eficacia a la hora de frenar la progresión de la enfermedad a estadios más severos o evitar la muerte de los pacientes<sup>43,44</sup>.

Entre los agentes inmunomoduladores probados, la administración de corticosteroides, el uso de anticuerpos monoclonales contra el receptor de la IL-6 (tocilizumab, sarilumab) y los inhibidores de las quinasas Janus (JAK) (baricitinib, tofacitinib) han demostrado un incremento de la supervivencia en pacientes con COVID-19 severo<sup>45-51</sup>. Además, la administración de plasma de pacientes convalecientes ha mostrado eficacia para reducir la mortalidad<sup>52-54</sup>. Finalmente, el uso de anticuerpos monoclonales como casirivimab/imdevimab o el regdanvimab han demostrado eficacia a la hora de disminuir la sintomatología de la COVID-19<sup>55,56</sup>.

### 1.5.1.- Terapias celulares para la COVID-19

Dada la limitada eficacia de los fármacos tradicionales y las pocas opciones terapéuticas disponibles, se propuso el uso de tratamientos basados en la administración de células del sistema inmunitario para tratar la COVID-19. La propuesta se debe a la evidencia científica de que aquellos individuos con linfopenia asociada a la COVID-19 tienen una peor prognosis<sup>57</sup>, y a que una infiltración de linfocitos T se asocia con una mayor supervivencia<sup>26</sup>.

A continuación, se presentan las distintas aproximaciones testadas usando terapias celulares para tratar la COVID19:

-Terapia con linfocitos T específicos de SARS-CoV-2: Debido al éxito demostrado en otro tipo de enfermedades infecciosas, se propuso el desarrollo de linfocitos T específicos contra antígenos del SARS-CoV-2. Los estudios realizados mostraron que estos linfocitos pueden responder contra antígenos virales y generar una respuesta

robusta y específica, demostrando su eficacia y seguridad para reducir la severidad de la enfermedad y favorecer la recuperación en ensayos clínicos<sup>58,59</sup>.

-Terapia con linfocitos *natural killer* (NK): Los linfocitos NK son cruciales para combatir infecciones virales. La respuesta mediada por los linfocitos NK se asocia directamente con una mayor supervivencia. Por lo tanto, se propuso que la administración de estas células podría ayudar a frenar la progresión de la enfermedad. Los ensayos clínicos que se han llevado a cabo han evaluado su eficacia con resultados favorables<sup>60</sup>.

-Terapia con linfocitos T reguladores (Treg): Los linfocitos Treg mantienen la homeostasis de la respuesta inmunitaria. En la COVID-19 severa, una menor presencia de Treg podría contribuir a la desregulación inmune y al estado de hiperinflamación. Por ello, se ha propuesto su administración para controlar la respuesta inmune en individuos con un estado de hiperinflamación<sup>61,62</sup>.

-Terapia con linfocitos con receptor de antígeno quimérico (CAR): Debido al éxito de este tipo de terapia en el ámbito oncológico, se ha propuesto el uso de linfocitos CAR para reconocer y eliminar las células infectadas por el SARS-CoV-2. En estudios preclínicos, el uso de linfocitos CAR-T o CAR-NK con especificidad para el virus permite controlar la infección<sup>63-65</sup>.

## **2.-Terapia con receptores de antígenos quiméricos**

### **2.1.-Origen de los receptores de antígenos quiméricos**

Los primeros estudios en los que se propone la redirección de la especificidad de un linfocito T a través de un receptor quimérico datan de la década de los 90. En estos, se generaron un receptor quimérico, el cuál fusionaba por un lado la cadena variable pesada (VH) de una inmunoglobulina (Ig) con afinidad por la fosfatidilcolina o por el 2,4,6-trinitrofenil a la cadena constante  $\alpha$  del receptor de células T (TCR), y por otro lado la cadena variable ligera (VL) a la cadena constante  $\beta$  del TCR. En ambos casos, los resultados obtenidos demostraron que este receptor quimérico era capaz de mediar la activación de los linfocitos T a través de una señalización independiente de la presentación antigénica mediada a través del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA)<sup>66,67</sup>.

Esta aproximación requería de la transducción simultánea con dos vectores diferentes (el que codifica para el tándem VH-TCR $\alpha$ , y el que codifica para el tándem VL-TCR $\beta$ ) de manera que la eficiencia de obtención de células que co-expresasen ambos transgenes a la vez era baja. Para solventar este problema se propuso la fusión de las cadenas pesada y ligera de la región variable de la Ig en una sola cadena polipeptídica,

generando lo que se conoce como *single chain variable fragment* (scFv). Se fusionó el scFv a las subunidades de señalización CD3ζ o del Receptor FCγ (FcγR), obteniendo así una activación y citotoxicidad específica por parte de los linfocitos T modificados contra el antígeno e independiente de la presentación de HLA<sup>68</sup>.

## 2.2.-Componentes de los CAR

Los CAR constan de cuatro dominios, que han sido ampliamente estudiados y tienen un impacto significativo sobre el funcionamiento de estos<sup>69,70</sup>:

•Dominio de unión: Para poder dirigir la especificidad del CAR hacia el antígeno deseado se utilizan principalmente dos tipos de moléculas: scFvs<sup>71,72</sup> y moléculas que son el ligando natural del antígeno<sup>73,74</sup>.

Dentro de la selección de los scFv hay que tener en cuenta el diseño de estos. En estudios previos, se ha determinado que la orientación de las cadenas variables VH y VL puede ser crítica para el funcionamiento del CAR<sup>75</sup>. Además, la afinidad y la fuerza de unión pueden alterar la señalización mediada a través de esta molécula quimérica<sup>76</sup>.

Otro aspecto crítico en el diseño del scFv es el elemento conector. Este juega un papel importante en dar estabilidad al scFv, además de tener implicaciones en la multimerización y agregación de los CAR<sup>77</sup>. Este fenómeno de agregación puede comportar la aparición de señalización independiente del antígeno, dando lugar al agotamiento prematuro de los linfocitos CAR-T<sup>78</sup>.

•Dominio espaciador: Es el dominio del CAR que separa el dominio de unión del dominio transmembrana. Este dominio determina la flexibilidad y la accesibilidad del CAR al antígeno<sup>79</sup>. Normalmente, para antígenos más distales a la membrana de la célula diana se usan espaciadores más cortos, mientras que, para los antígenos más proximales, se usan espaciadores más largos<sup>76,80</sup>.

•Dominio Transmembrana: Es la región encargada de transmitir la señal proveniente de los dominios extracelulares hacia el dominio intracelular. En la mayoría de los diseños, predomina el uso de los dominios transmembrana de las proteínas CD28, CD4 o CD8<sup>70</sup>.

•Dominio intracelular o dominio de señalización: En función de la generación de CAR a la que pertenezcan, esta región puede estar formada por uno o más dominios de señalización<sup>79</sup>. De forma similar a la activación fisiológica de los linfocitos T, se ha visto que los CAR requieren de una señal de activación, la cual está mediada en la mayoría de los casos por el dominio de señalización CD3ζ. Este dominio se basa en los motivos

de activación del inmunoreceptor de tirosina (ITAM), que cuando son fosforilados permiten la transducción de la señal<sup>81</sup>.

Además, se ha visto que los CAR necesitan de una señal de co-estimulación, la cual ha permitido mejorar la proliferación, la persistencia y reducir el agotamiento de los linfocitos CAR-T, mejorando enormemente su eficacia clínica<sup>72,82-85</sup>. Esta co-estimulación es mediada de manera fisiológica por la interacción de CD28 con los receptores CD80-CD86 de las células presentadoras de antígenos (APC). Cuando esta no se produce, los linfocitos T alcanzan rápidamente un estado de agotamiento<sup>86</sup>. En el caso de los CAR, se han descrito diferentes dominios de co-estimulación, pero la mayoría están basados en los dominios intracelulares de CD28 y 4-1BB. El uso de uno u otro dominio dota a los CAR de diferentes características. Mientras se ha descrito que el uso de CD28 genera una activación más rápida y potente del linfocito CAR-T, la co-estimulación por 4-1BB genera una activación más moderada pero persistente en el tiempo<sup>87,88</sup>. De hecho, se ha descrito que la persistencia de los CAR-T basados en el dominio CD28 no va más allá de los pocos meses, mientras que aquellos basados en 4-1BB persisten durante años en el paciente<sup>89,90</sup>. Estas diferencias hacen que el uso de uno u otro dominio pueda ser más conveniente en diferentes tipos de enfermedades<sup>70</sup>.

### 2.3.-Evolución de los CAR a lo largo del tiempo

Debido a los buenos resultados en clínica, el interés por la investigación en el ámbito de los CAR ha crecido exponencialmente. Actualmente, se han generado múltiples propuestas de nuevos formatos de CAR, conocidas como generaciones de linfocitos CAR-T (**Figura 4**)<sup>91</sup>:

•**CAR de primera generación:** Son los primeros CAR que se generaron. Constan de un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de activación basado en motivos ITAM. Pese a ser capaces de mediar la activación del linfocito T, no muestran respuesta en ensayos clínicos<sup>92-94</sup>.

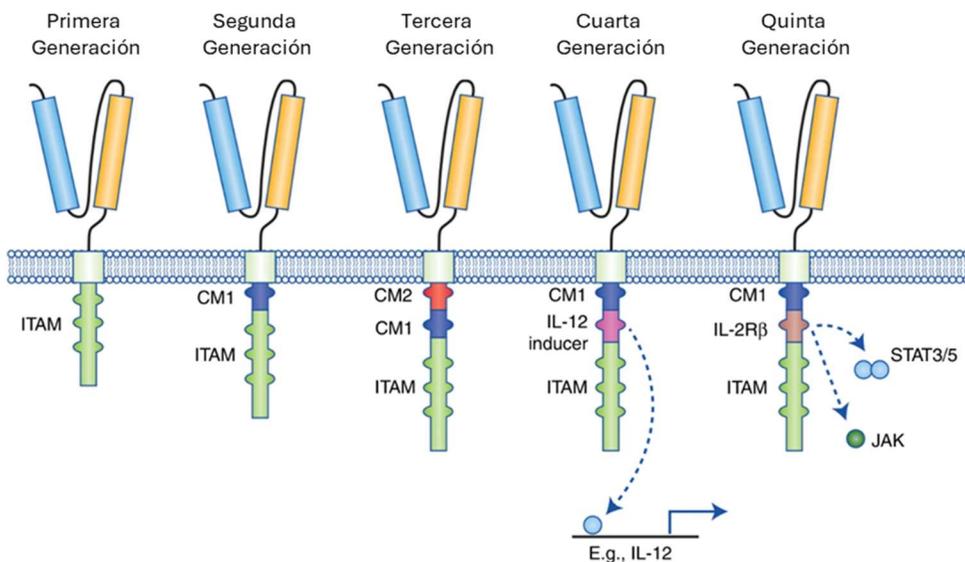
•**CAR de segunda generación:** La estructura de estos CAR se basa en añadir un dominio de co-estimulación que mejora su proliferación y persistencia. Está compuesto por un dominio de señalización de las superfamilias de los receptores de Ig o de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Con la adición de este dominio, se mejoró enormemente la tasa de respuestas terapéuticas en ensayos clínicos<sup>86-88</sup>.

•**CAR de tercera generación:** Los CAR de tercera generación presentan dos dominios de co-estimulación en su región intracelular. Normalmente, un dominio pertenece a la

familia de los receptores Ig y el otro a la de TNFR. Se ha descrito que tienen una mejor función efectora que sus antecesores<sup>95-97</sup>.

•**CAR de cuarta generación:** Se caracterizan por ser capaces de secretar algún agente biológico, (p.ej. citocinas o anticuerpos monoclonales), que pueda remodelar el microambiente tumoral o bien que sea capaz de mediar de forma autocrina o paracrina una mayor activación del linfocito T<sup>98,99</sup>.

•**CAR de quinta generación:** La última generación de CAR se basa en los de la segunda generación, con un solo dominio de co-estimulación. La diferencia con estos es que se añade un dominio truncado del receptor Interleucina(IL)2R $\beta$ . La señalización a través de este inicia la activación de la vía JAK-STAT, promoviendo la expresión de genes que mejoran la funcionalidad del CAR. Este nuevo módulo de señalización actúa como la señal correspondiente a la mediada por las citoquinas para la completa activación de los linfocitos T en un contexto fisiológico<sup>91,100</sup>.



**Figura 4 Representación esquemática de la estructura proteica de las diferentes generaciones de moléculas CAR.** Extraído de: N Tokarew, 2019

## 2.4.-Limitaciones actuales de la terapia CAR-T

Pese al gran éxito de las terapias CAR-T, se ha visto este tipo de terapia presenta ciertas limitaciones (**Figura 5**):

•Escape Antigénico: Pese a la alta tasa de respuesta duradera de las principales terapias CAR-T, dirigidas contra los antígenos CD19 y BCMA, se ha observado que un porcentaje de los individuos recae con la presencia de células tumorales que ya no expresan el antígeno o epítipo diana, haciéndose así resistentes al tratamiento.<sup>84,101</sup> Para intentar evitar este escape antigénico, se ha propuesto el uso de CARs duales o CARs en tándem para poder redirigir los linfocitos CAR-T hacia más de una molécula sobreexpresada en las células tumorales<sup>102</sup>.

•Toxicidad derivada de la actividad de los linfocitos CAR-T: Pese a ser una gran herramienta terapéutica, el uso de la terapia CAR-T no está exento de efectos secundarios no deseados. Se pueden identificar diferentes tipos de efectos tóxicos derivados del uso de esta terapia:

-Síndrome de liberación de citocinas (CRS): Este efecto adverso se debe a la propia activación de los linfocitos CAR-T infundidos en el paciente. Al encontrar el antígeno contra el que van dirigidos, la actividad de los linfocitos genera un ambiente proinflamatorio resultando en altos niveles de citocinas inflamatorias, como Interferón(IFN) $\gamma$ , IL-6, IL-10 o el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)<sup>103,104</sup>. La sintomatología asociada a un CRS puede ir desde un cuadro clínico leve, hasta un fallo multiorgánico e incluso la muerte del paciente.

Se ha asociado la severidad del CRS a diversos factores, entre los que destacan el régimen de condicionamiento previo a la infusión del tratamiento, la dosis de CAR-T y la carga tumoral del paciente<sup>84,105</sup>. Se han descrito diversas vías para tratar los síntomas asociados al CRS, como la administración de tocilizumab (bloqueante del receptor de la IL-6), o tratamiento inmunosupresor con corticosteroides de amplio espectro<sup>84,106</sup>.

-Neurotoxicidad (ICANS): Los mecanismos por los cuales ocurre la neurotoxicidad aún no han sido dilucidados. Se asocia en la gran mayoría de casos al CRS. Se postula que una inflamación periférica debida a la actividad de los linfocitos CAR-T podría provocar una inflamación en el sistema nervioso mediada por células mieloides, macrófagos y la microglía<sup>107</sup>. Las manifestaciones clínicas de este efecto adverso van desde afasia, disgrafía y temblores, hasta convulsiones o coma en los casos más graves<sup>108</sup>.

Normalmente, esta neurotoxicidad es tratada con corticosteroides, revertiéndose los síntomas en la mayoría de los casos<sup>107</sup>.

-Toxicidad *On-target off-tumor*: Al diseñar un CAR, se suele redirigir la especificidad hacia antígenos que se sobreexpresan en las células diana. Pero en la mayoría de los casos, estos antígenos también se expresan en tejidos sanos. De esta manera, los linfocitos CAR-T podrían mediar su efecto sobre tejidos sanos, pudiendo tener implicaciones leves o severas<sup>109</sup>. En la mayoría de los pacientes tratados con CAR dirigidos a marcadores de células B se ha descrito una aplasia de estas células que puede llevar a la aparición de infecciones oportunistas, que pueden ser resueltas mediante transfusión de inmunoglobulinas<sup>110</sup>. En otros escenarios más graves, este tipo de toxicidad ha llevado a la muerte del paciente, como se describió en un ensayo clínico para un CAR dirigido contra HER2<sup>111</sup>.

La mayoría de los individuos tratados con la terapia CAR-T manifiestan al menos algún efecto adverso asociado a la actividad del tratamiento<sup>112</sup>. Para evitar esta toxicidad se ha puesto el foco en limitar la actividad del linfocito CAR-T, a través del uso de CARs duales<sup>113</sup>, o estrategias que terminen con su actividad como los *shut-off* CARs<sup>114</sup> o el uso de genes suicida<sup>115</sup>.

•Baja tasa de respuesta en tumores sólidos: El éxito obtenido en tumores hematológicos no se ha podido trasladar a los denominados tumores sólidos, por dos motivos principales. El primero, la presencia de barreras físicas como el estroma tumoral o la alta densidad de matriz extracelular en los tumores que impiden una mayor infiltración de los linfocitos T en el tumor<sup>116</sup>. Para solventar este inconveniente, se está estudiando la administración intratumoral de la terapia<sup>117,118</sup>, la sobreexpresión de quimiorreceptores que mejoren el tráfico hacia el tumor,<sup>119</sup> o bien la expresión de enzimas que permitan degradar la matriz extracelular<sup>120</sup>, facilitando así la infiltración.

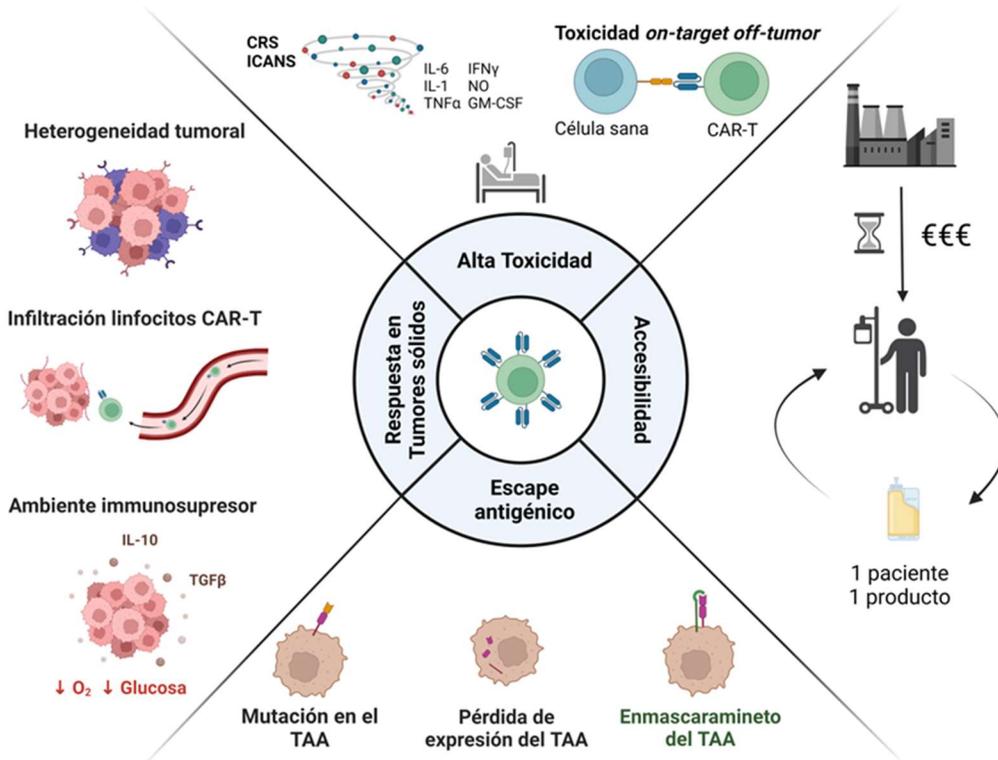
El segundo factor limitante es el microambiente tumoral. Dentro del tumor encontramos diferentes tipos celulares (macrófagos asociados al tumor, fibroblastos asociados al tumor, células supresoras de origen mieloide o linfocitos Treg) que son capaces de ejercer un efecto inmunosupresor sobre los linfocitos CAR-T, limitando así la persistencia de su actividad citotóxica<sup>116</sup>. Para mitigar esta inmunosupresión, se están diseñando CARs de cuarta generación, o se intenta impedir la señalización a través de receptores implicados en la inmunosupresión, ya sea a partir de la combinación con anticuerpos bloqueantes contra moléculas como la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o el antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4)<sup>121</sup>, o la generación de linfocitos T deficientes para estos receptores mediante el uso de tecnología de edición génica<sup>122</sup>.

Finalmente, también cabe destacar la alta heterogeneidad en los antígenos asociados a tumor (TAA) expresados en los tumores sólidos. De hecho, se ha descrito que la expresión de estos TAA hacia los que dirige el CAR puede ser muy diferente entre individuos, pero también entre el tumor primario y el metastático del mismo paciente, lo que significa que en algunos casos la terapia CAR-T puede no ser efectiva porque algunas células tumorales escaparían del reconocimiento por parte de los linfocitos modificados<sup>123</sup>.

•Manufactura y accesibilidad de los productos CAR-T: Actualmente, el proceso de producción de la terapia CAR-T es un proceso con un alto coste económico, limitando la accesibilidad a este tratamiento. Además, el proceso de manufactura conlleva un tiempo de producción largo, que puede resultar en retrasos en la administración del producto terapéutico, siendo un punto crítico porque en determinados pacientes la enfermedad progresa rápidamente<sup>124-126</sup>.

Para intentar mediar un abaratamiento de los costes y una reducción en el tiempo de administración, se están intentando implementar métodos de producción como el *point-of-care*, en que la manufactura de la terapia se lleva a cabo en el propio hospital<sup>127,128</sup>. Otra aproximación sobre la cual se está investigando actualmente, y que se ha probado ya en ensayos clínicos, es el uso de un producto CAR-T alogénico<sup>129</sup>.

# Limitaciones Terapia CAR-T



**Figura 5** Representación esquemática de las principales limitaciones de la terapia CAR-T. Incluyendo los problemas de toxicidad, accesibilidad, baja tasa de respuesta en tumores sólidos y el escape antigénico debido a la modificación del antígeno asociado a tumor (TAA) contra el que se dirige la terapia. Generado a través de BioRender

### 3.-Generación de linfocitos CAR-T alogénicos

Normalmente, la producción de las terapias CAR-T se lleva a cabo de forma autóloga. Es decir, se extraen los linfocitos T del propio paciente y se modifican genéticamente para que expresen el CAR. El otro método de producción de esta terapia es la producción alogénica, donde los linfocitos T provienen de un donante sano<sup>130</sup>. Pese a que la diferencia principal solo es la fuente de los linfocitos T, se ha descrito que el uso de una u otra forma de producción puede presentar beneficios o inconvenientes respecto la otra<sup>131</sup>:

•Calidad del producto terapéutico: Debido a que los pacientes que llegan a ser tratados con una terapia CAR-T autóloga han pasado por múltiples líneas de tratamiento, además generalmente estos pacientes manifiestan linfopenia, así como una mayor proporción de linfocitos T exhaustos, la calidad del producto administrado se considera sub-óptima<sup>132,133</sup>. En contraste, los linfocitos T provenientes de un donante sano no han sido sometidos a tratamientos agresivos, encontrándose en un estado óptimo para efectuar su función<sup>134</sup>.

•Tiempo de producción/administración: El tiempo estimado para la producción de una terapia CAR-T, sin tener en cuenta el tiempo del control de calidad, se estima en unos 10-14 días si no hay algún contratiempo asociado a la propia manufactura. En el peor de los casos, este tiempo puede demorarse hasta meses. En este tipo de enfermedades linfoproliferativas, la progresión de la enfermedad es rápida. Durante el tiempo de producción, los pacientes pueden padecer complicaciones en su estado de salud que les impida recibir la administración de la terapia<sup>85,135</sup>.

En una producción de linfocitos CAR-T de forma alogénica, el producto terapéutico puede estar manufacturado con antelación, de manera que se pueda administrar al paciente en el momento que este lo requiera(*off-the-shelf*).

•Posibilidad de producción a gran escala: Al hacer producción de forma autóloga, se está generando un producto personalizado. Además, debido a la urgencia de la administración del producto terapéutico, a la poca cantidad inicial de linfocitos T y a la imposibilidad de alargar la expansión de los linfocitos en el tiempo, es difícil obtener un número elevado de linfocitos CAR-T con los que obtener más de una dosis del producto terapéutico. Sin embargo, la producción alogénica, en tanto que no es un producto personalizado, permitiría la administración de este a varios individuos. Además, podría realizarse una producción a gran escala para la obtención de una gran cantidad de linfocitos CAR-T con los que generar múltiples dosis del producto terapéutico<sup>136</sup>.

-Aparición de efectos secundarios: La producción de forma autóloga no presenta problemas de histocompatibilidad. Por el contrario, los linfocitos T provenientes de donantes sanos pueden no ser compatibles con el haplotipo de HLA del paciente. Esta incompatibilidad puede dar lugar a una respuesta alogénica de los linfocitos CAR-T hacia los tejidos del paciente, generándose una enfermedad de injerto contra receptor (GvHD). Esta puede causar una gran cantidad de efectos adversos, que, en casos extremos, pueden poner en riesgo la vida del paciente<sup>131</sup>.

•Persistencia del producto terapéutico: Dentro del mismo contexto de histocompatibilidad, los linfocitos T provenientes de un donante alogénico pueden ser reconocidos y eliminados por el sistema inmune del paciente. Esto conllevaría a una persistencia limitada de los linfocitos CAR-T en el paciente, comprometiendo el efecto terapéutico de esta terapia <sup>137</sup>.

El uso de una fuente alogénica de linfocitos T para la producción de terapias CAR-T podría solventar alguna de las limitaciones cómo la accesibilidad o la calidad del producto terapéutico, siempre y cuando se consiga eliminar la aparición de los efectos no deseados como el GvHD o el rechazo del producto terapéutico.

	Tiempo	Calidad del producto	Coste	Problemas de Aloreactividad
Producción Autóloga	El tiempo de producción requiere de al menos 2 Semanas para la administración al paciente.  Pueden producirse retrasos por fallos de producción. Que pueden imposibilitar la administración de la terapia por empeoramiento del estado de salud del paciente.	La producción se realiza a partir de linfocitos de pacientes que han pasado por múltiples líneas de tratamiento.  El estado de los linfocitos T es subóptimo: fenotipo de agotamiento, menor capacidad de expansión y de actividad citotóxica.	El producto terapéutico es personalizado, y debido al límite de tiempo de producción, tan solo se genera una única dosis.  Esto implica un elevado coste de producción para la terapia.	Al ser los linfocitos del propio individuo no se generan eventos de aloreactividad porque las moléculas de MHC son las propias. Esto hace que no se den episodios de GvHD, y que la persistencia de la terapia en sangre sea muy elevada
Producción Alogénica	Posibilidad de producción antes de que llegue el paciente.  Criopreservación del producto una vez ya validado.  Disponibilidad inmediata para la administración de la terapia.	La producción se realiza a partir de linfocitos de individuos sanos.  El estado de los linfocitos T se considera óptimo, mayor capacidad de expansión y de actividad citotóxica.	La posibilidad de trabajar sin límite de tiempo y con un producto no personalizado, permite la producción a gran escala, disminuyendo el coste de la terapia significativamente	Al ser linfocitos de donantes alogénicos, puede haber un reconocimiento entre moléculas de MHC no-propias. Esto puede llevar a la aparición de GvHD, así como a limitar la persistencia del producto terapéutico en el paciente.

**Tabla 1** Tabla comparativa sobre las principales características de la producción de terapias CAR-T de forma autóloga o alogénica

### 3.1.-Respuesta alogénica y aloreconocimiento

Hace muchos años se estableció que, debido a la disparidad genética entre individuos, sean o no de la misma especie, existe un rechazo de las células o tejidos que se intentan trasplantar dentro de un organismo multicelular. Este rechazo recibe el nombre de respuesta alogénica <sup>138,139</sup>. En mamíferos, esta respuesta alogénica es la que

provoca el rechazo de un órgano trasplantado. En este caso la incompatibilidad genética está determinada por la expresión de los antígenos de histocompatibilidad menores, pero principalmente por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad<sup>140,141</sup>.

Los genes que codifican para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad son altamente polimórficos. La principal función de estas moléculas es la presentación antigénica, permitiendo a las células del sistema inmune distinguir entre aquello que es propio y lo foráneo. Las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad se dividen en dos grupos: moléculas de clase I y de clase II. Las diferencias entre estas dos radican principalmente en la estructura proteica y en que la expresión de las moléculas de clase II tan solo se produce en las células presentadoras de antígenos, aunque su expresión también se ha descrito en linfocitos T activados<sup>142</sup>.

•HLA de clase I: Son heterodímeros formados por una cadena  $\alpha$ , que puede provenir de la expresión de tres genes distintos (HLA-A, HLA-B o HLA-C), y una cadena constante denominada  $\beta$ -2 microglobulina<sup>142</sup>. El proceso de presentación antigénica a través de las moléculas de clase I ocurre de la siguiente manera:

En primer lugar, se da la traducción de la cadena  $\alpha$  y de la  $\beta$ 2m, las cuales son translocadas al RE. Una vez en el RE, ambas cadenas se ensamblan para formar una molécula de HLA de clase I vacía. Seguidamente, se carga el complejo vacío a través de la interacción con el complejo de carga de péptidos, formado por la ATPasa TAP, y la tapasina. Una vez completada la carga, la molécula HLA-péptido entrará en la vía de secreción para ser expresada en superficie celular, donde podrá ser reconocida por los linfocitos T CD8+<sup>143</sup>.

•HLA de clase II: Son heterodímeros formados por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  polimórficas. Dentro de estas moléculas encontramos tres *loci* distintos: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Dentro de cada *locus* hay dos genes que codifican para la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  de cada uno de los subtipos de HLA de clase II<sup>142</sup>. El proceso de presentación antigénica a través de moléculas de clase II ocurre por una vía diferente al de clase I:

Durante la síntesis de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  en el RE, estas se ensamblan en un complejo ternario junto a una cadena polipeptídica denominada como cadena invariante. Este complejo ternario es transportado a un compartimento vesicular conocido como el compartimento de procesamiento antigénico. En este, se produce el intercambio de la cadena invariante por un péptido, en un proceso dependiente de la proteasa CLIP y de

la enzima HLA-DM. Una vez formado el complejo HLA-péptido, este es expresado en la superficie celular donde será reconocido por los linfocitos T CD4+ <sup>144</sup>.

Durante el desarrollo de los linfocitos T, estos son seleccionados para mediar una respuesta contra péptidos foráneos presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad propias. A través de este proceso, los linfocitos T propios son capaces de reconocer como extrañas las moléculas de HLA con un polimorfismo diferente para el cuál no han sido seleccionados. Este reconocimiento de moléculas de HLA foráneas es el principal mecanismo a través del que se genera una respuesta alogénica <sup>145</sup>.

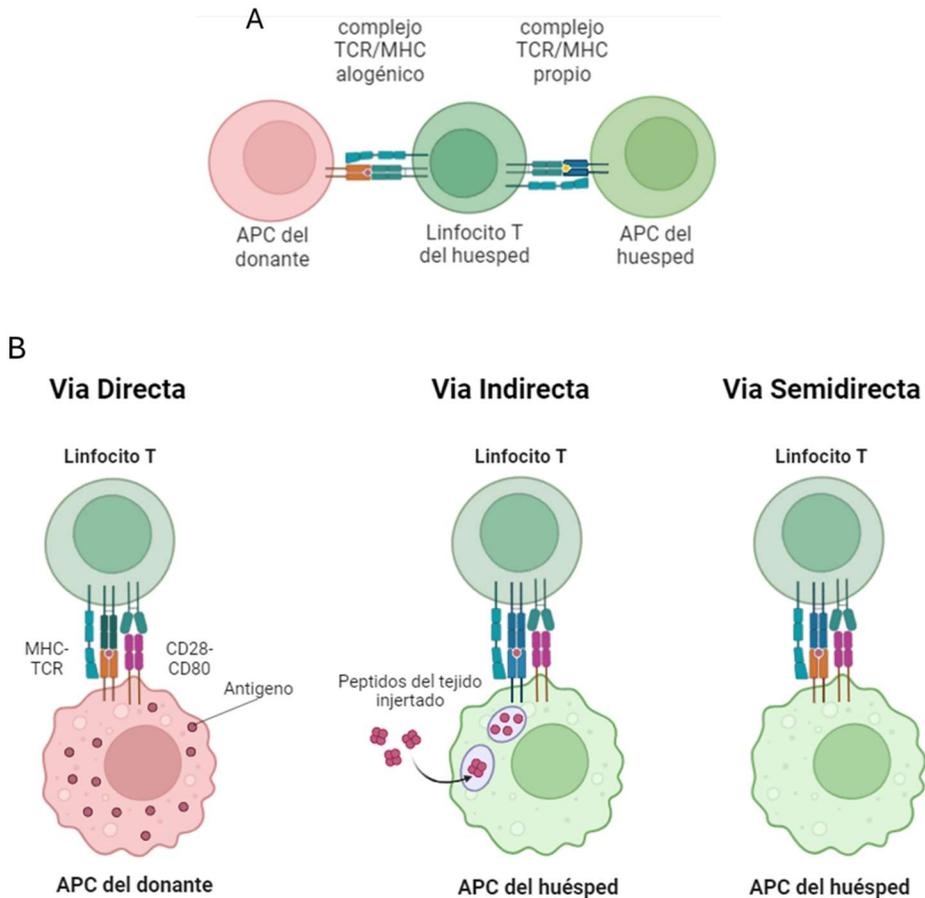
Los primeros estudios mostraban una alta frecuencia de linfocitos T reactivos frente a complejos HLA-péptido alogénicos, lo que llevo a pensar que era una respuesta degenerada e independiente del péptido presentado. Sin embargo, con el paso del tiempo, se llegaron a encontrar linfocitos T reactivos específicos para un péptido en un contexto alogénico, sugiriendo que la naturaleza de la especificidad en la respuesta alogénica puede ser más compleja. A nivel molecular, se ha descrito que la interacción de un TCR con un HLA-péptido alogénico es muy similar a la interacción convencional de un TCR con una HLA-péptido propio <sup>146</sup>.

### 3.2.- Patofisiología y mecanismos moleculares de la respuesta alogénica

Dentro de la respuesta alogénica, se identifican tres mecanismos o vías diferentes (**Figura 6**):

1. Vía directa: En esta vía, los leucocitos residentes en el tejido injertado pueden migrar de este hacia los nódulos linfáticos. Una vez allí, los linfocitos T del receptor pueden reconocer directamente las moléculas de HLA foráneas presentes en los leucocitos alogénicos, iniciando así una respuesta frente al tejido injertado <sup>147,148</sup>.
2. Vía indirecta: Esta respuesta es también mediada por los linfocitos T, pero en este caso participan las APC. Las APC pueden fagocitar células del tejido injertado y presentar, a través de sus moléculas de HLA, péptidos foráneos del injerto. Estos péptidos pueden ser reconocidos por los linfocitos T, generándose una respuesta contra el tejido injertado <sup>149,150</sup>.
3. Vía semidirecta: Esta vía se caracteriza porque una APC adquiere en su superficie una molécula de HLA-péptido del injerto. Los linfocitos T pueden reconocer esta molécula exógena en la membrana de la APC y mediar una

respuesta. Se denomina “semidirecta” porque el HLA foráneo es reconocido en una célula propia <sup>151</sup>. Aunque estudios más recientes especulan que esta vía “semidirecta” podría ser una forma de obtener las moléculas de HLA alogénicas del injerto para ser luego presentadas e iniciar la verdadera respuesta a través de la vía indirecta <sup>152</sup>.



**Figura 6 Representación esquemática del alorecognition a nivel molecular y (B) de las principales vías de reconocimiento en un contexto de trasplante alogénico. Generado a través de BioRender**

La caracterización de esta respuesta se dio en un contexto de trasplante de un órgano sólido o un injerto de piel en un huésped inmunocompetente. Sin embargo, la forma en que ocurre esta respuesta alogénica cambia si el tejido trasplantado es el tejido inmunitario, como en el trasplante de progenitores hematopoyéticos o de médula ósea.

En este contexto, la respuesta alogénica puede mediar en la dirección opuesta, donde los linfocitos trasplantados pueden reconocer a las células del receptor como

extrañas. Esta respuesta alodénica se conoce como GvHD y se caracteriza por una inflamación exacerbada y la destrucción de las células del tejido del paciente, en un proceso que incluye 3 fases diferenciadas (**Figura 7**)<sup>153,154</sup>:

1.- Fase de activación de las APC: Esta fase ocurre antes de la infusión de los linfocitos T provenientes del paciente. En el contexto de un paciente que recibirá un trasplante de linfocitos T o progenitores hematopoyéticos, el tratamiento con quimioterapia previa o el uso de los fármacos para el condicionamiento previo al trasplante generan un daño sobre los tejidos del individuo, especialmente en el tracto gastrointestinal. Este daño provoca un estado de inflamación, que se manifiesta con la secreción de diferentes citocinas proinflamatorias, alarminas y DAMPs, y una mayor expresión de moléculas de adhesión en los tejidos afectados<sup>155-158</sup>. Estas señales promueven la migración de las APC del receptor hacia la zona del daño, donde se activarán y luego retornarán a los tejidos linfáticos secundarios para mediar la presentación antigénica<sup>159</sup>.

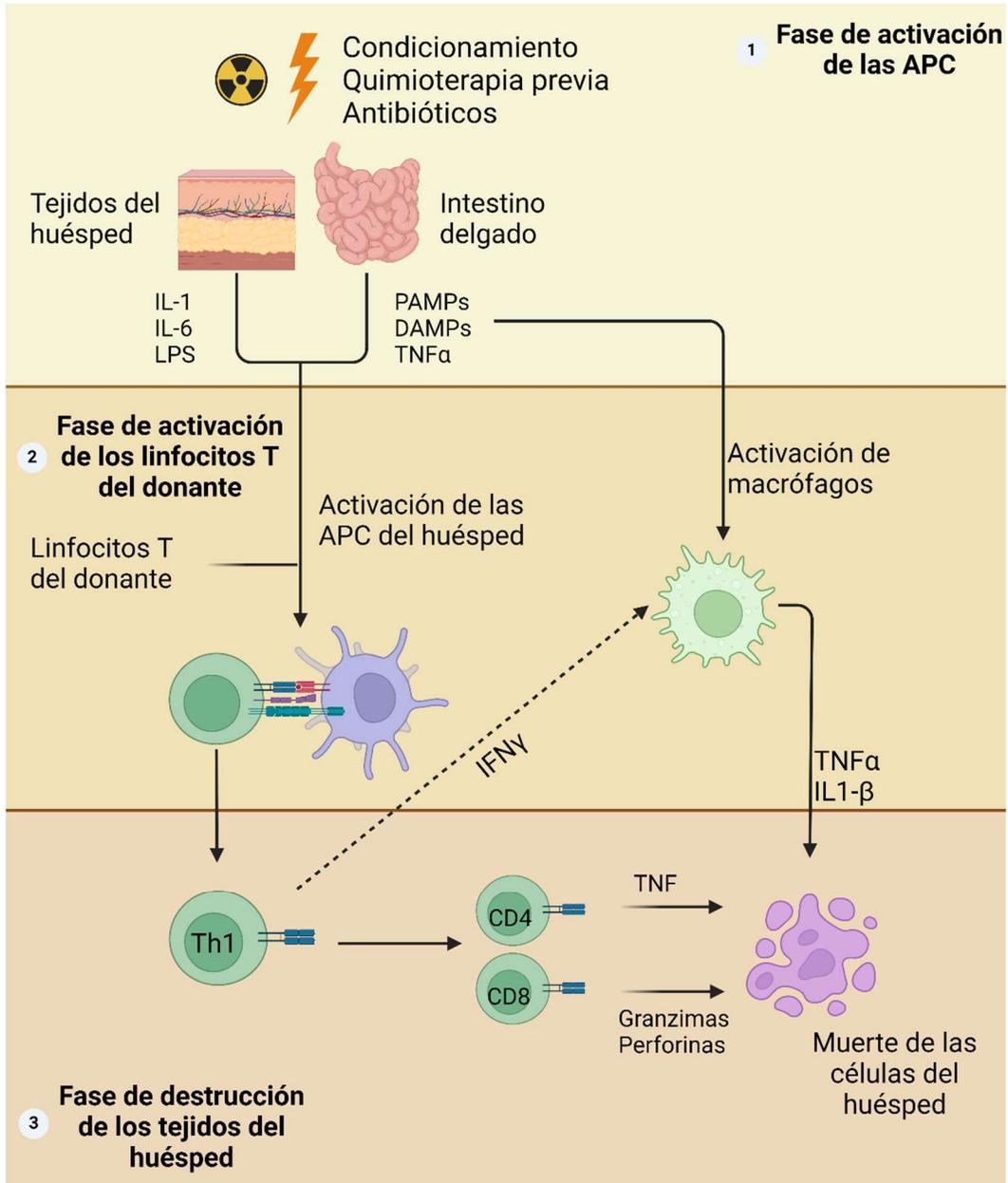
### 2.- Fase de activación y migración de los linfocitos T alodénicos

Una vez infundidos en el paciente, los linfocitos T empezaran a recircular por los órganos linfoides secundarios. En este espacio, los linfocitos T pueden encontrarse con las APC previamente activadas, que podrán estimular a los linfocitos T alodénicos<sup>160,161</sup>. La activación de los linfocitos T promueve cambios en la expresión génica, destacando un incremento en la expresión genes asociados a la producción de citocinas y a moléculas de adhesión y migración. Este cambio en el patrón de expresión permite a los linfocitos migrar hacia el tejido dañado<sup>153,154,162</sup>.

### 3.- Fase efectora y de destrucción del tejido

Una vez que los linfocitos T llegan al tejido dañado, median su actividad citotóxica en los tejidos del paciente a través de mecanismos de lisis y muerte celular.<sup>163</sup> Además, estos linfocitos también secretan citocinas que promueven un ambiente inflamatorio exacerbado<sup>164,165</sup>.

La severidad del cuadro clínico debido a la GvHD depende de la fase efectora y de los tejidos afectados, así como de la intensidad de la respuesta. Aunque la GvHD puede ocurrir en cualquier tejido, los más afectados suelen ser la piel, el hígado y el tejido gastrointestinal. De hecho, la evaluación clínica de esta enfermedad se hace en base al grado de afectación de estos tejidos (**Tablas 2 y 3**)<sup>153,166</sup>.



**Figura 7** Representación esquemática de mecanismo patofisiológico del GvHD por fases: 1. Fase de activación de las APC del huésped debido al daño provocado en los tejidos por el efecto del condicionamiento o el uso de fármacos previos. 2. Fase de activación de los linfocitos T del donante alogénico a través de su interacción con las moléculas de HLA del huésped presentadas por las APC. 3. Fase de destrucción de los Tejidos del huésped, mediada a través de la actividad de los linfocitos T CD4 y CD8 a través de la acción de diferentes compuestos (TNF, granzimas o perforinas). Generado a través de BioRender

Estadio	Piel en base a la erupción maculopapular	Hígado en base a la bilirrubina	Intestino en base a la cantidad de diarrea
+	<25% de la superficie	34–50 $\mu\text{mol/L}$	500–1000 mL
++	25–50% de la superficie	51–102 $\mu\text{mol/L}$	1001–1500 mL
+++	Eritrodermia generalizada	103–255 $\mu\text{mol/L}$	>1500 mL
++++	Eritrodermia generalizada con ampollas y descamación	>255 $\mu\text{mol/L}$	Dolor abdominal severo con o sin íleo

**Tabla 2** Clasificación de la severidad de las manifestaciones clínicas asociadas a GvHD. Extraído de doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_43

Grado	Manifestaciones clínicas
I	Piel (+ o ++)
II	Piel (+ o +++), GI y/o hígado (+), Disminución leve en el desempeño clínico
III	Piel (++ o +++), GI y/o hígado (++ o +++), Disminución marcada en el desempeño clínico
IV	Piel (++ o ++++), GI y/o hígado (++ o ++++), Disminución extrema en el desempeño clínico

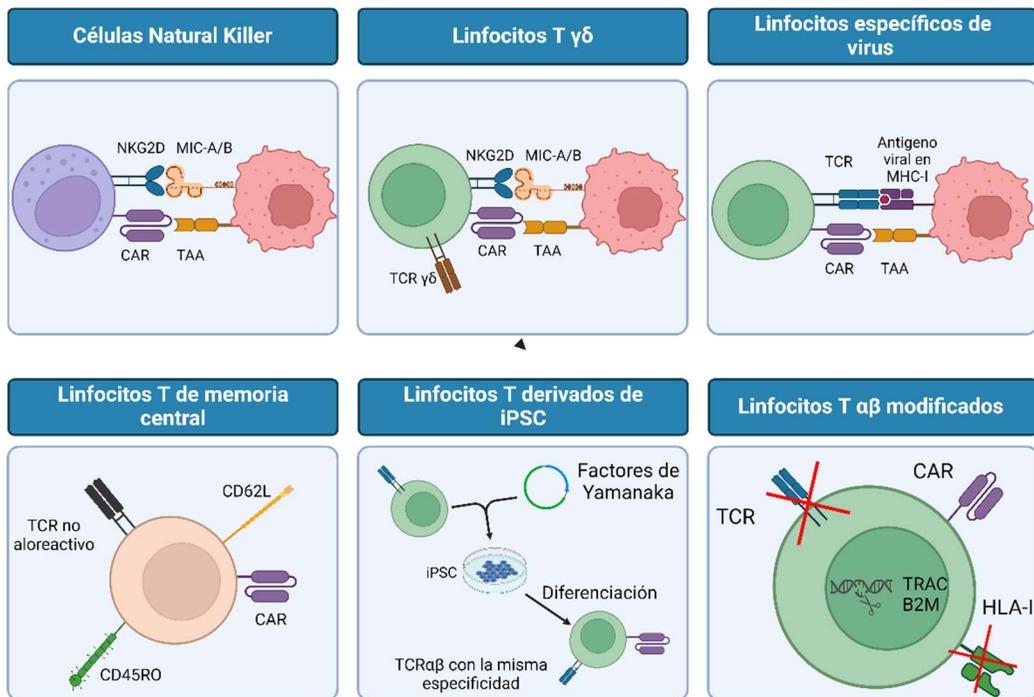
**Tabla 3** Escala de gradación de GvHD en base a las manifestaciones clínicas. Extraído de doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_43

En el contexto de una terapia CAR-T alogénica, se daría el caso de que estaríamos infundiendo linfocitos T que, pese a expresar una molécula CAR, aún conservan la expresión de su TCR endógeno. Este TCR endógeno podría reconocer las moléculas de HLA-péptido del paciente y mediar una respuesta alogénica contra los diferentes tejidos del paciente a través de la vía directa, generando así una GvHD<sup>131</sup>. A su vez, el sistema inmune del paciente también puede reconocer las moléculas de HLA-péptido expresadas en los linfocitos CAR-T que han sido infundidos. A través de las vías directa o indirecta, puede producirse un rechazo de los linfocitos CAR-T. En este caso, el principal inconveniente es que la desaparición de los linfocitos CAR-T haría que se perdiese el posible efecto terapéutico<sup>137,167</sup>.

Para mitigar estos efectos secundarios que limitan la implantación de las terapias CAR-T alogénicas, se está investigando el uso de diferentes fuentes y estrategias.

### 3.3.-Estrategias para evitar la aparición de GvHD

Actualmente, las principales estrategias para generar terapias CAR-T alogénicas se pueden clasificar en dos grupos. El primer grupo incluye las estrategias que se basan en la obtención de una fuente de células menos propensas a generar una respuesta alogénica. El segundo grupo comprende las estrategias que se basan en la modificación génica de los linfocitos T para inhibir la expresión de las moléculas y los receptores involucrados en la respuesta alogénica (**Figura 8**)<sup>131</sup>.



**Figura 8 Representación esquemática de las principales fuentes de linfocitos para realizar una terapia CAR de forma alogénica.** Adaptado de: Aparicio C, 2023

#### 3.3.1.- Células Natural Killer

Los linfocitos NK son células del sistema inmunitario innato con gran capacidad citotóxica, comprobada en modelos murinos y ensayos clínicos. Comparados con los linfocitos T, presentan ventajas, como no causar GvHD y evitar los efectos tóxicos de los linfocitos CAR-T, como el CRS y la neurotoxicidad. Además, pueden reconocer células tumorales sin la necesidad de HLA, además, la expresión de HLA se reduce en tumores como un mecanismo para evadir al sistema inmune adaptativo<sup>168</sup>.

A pesar de sus beneficios, el uso de células NK en terapias CAR enfrenta retos significativos. El primero es la limitada disponibilidad de estas células a partir de sangre periférica, lo que dificulta la obtención de una cantidad suficiente para terapias. Si bien la sangre de cordón umbilical ofrece mejores cantidades, su acceso es limitado. Además, los métodos actuales de expansión *ex vivo*, basados en citocinas, no logran una proliferación adecuada. El uso de células *feeder* ha mostrado mejores resultados, aunque con riesgos de contaminación del producto con estas células accesorias<sup>169</sup>. Otro desafío es la baja eficiencia en la transducción de las células NK con vectores lentivirales, lo que podría solucionarse con mejoras en la ingeniería de estos vectores<sup>170</sup>.

A nivel funcional, las células NK tienen baja persistencia *in vivo* y son vulnerables al microambiente tumoral, lo que limita su efectividad<sup>171</sup>. Varias líneas de investigación buscan mejorar la persistencia y el tráfico hacia los tumores de los CAR-NK, ya sea mediante la secreción de IL-15 o la optimización de los dominios de señalización del CAR para que se adapten mejor a la biología de estas células<sup>172</sup>. Aunque ya hay algunos ensayos clínicos probando alguna de estas nuevas aproximaciones, la información de la que se dispone es insuficiente para asegurar si estas estrategias son capaces de solventar la persistencia limitada del tratamiento<sup>168</sup>.

### 3.3.2.- Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos  $\gamma\delta$  son un grupo de linfocitos T que expresan un TCR no clásico basado en las cadenas gamma y delta. En un individuo adulto, este tipo de linfocitos representa una baja proporción de los linfocitos en sangre periférica (alrededor del 5%)<sup>173</sup>. Esta clase de linfocitos no recircula por los tejidos linfoides secundarios, sino que se encuentran en diferentes tejidos como la piel, la mucosa intestinal o el parénquima pulmonar. Esto se debe a que su función principal es actuar como una primera línea de defensa frente a agentes infecciosos. Además, juegan un papel crucial en la inmunovigilancia tumoral; de hecho, una mayor infiltración de estos linfocitos en algunos tumores sólidos se correlaciona con una mejor prognosis<sup>174,175</sup>.

Se caracterizan por tener rasgos atribuibles a la inmunidad innata, ya que el reconocimiento de cuerpos foráneos es independiente de la presentación antigénica a través de los complejos de HLA<sup>174</sup>. Pese a ello, mantienen la capacidad de formar memoria inmunológica<sup>176</sup>.

Se ha demostrado la eficacia de la combinación de estos linfocitos  $\gamma\delta$  con la expresión de una molécula CAR en diferentes modelos preclínicos de enfermedad<sup>173,177</sup>. Además, al no reconocer las moléculas de HLA, se ha observado que no generan GvHD al ser trasplantadas en un individuo alogénico, siendo una fuente atractiva para la generación de terapias alogénicas<sup>178</sup>.

Sin embargo, su aplicación presenta ciertos inconvenientes debido a la escasez de estos en sangre periférica, a su baja tasa de expansión *ex vivo* y su persistencia limitada<sup>179</sup>. También se ha descrito que en algunos casos algunos subtipos de linfocitos  $\gamma\delta$  pueden mediar un efecto protumorigénico, en parte debido al efecto que puede tener el microambiente tumoral sobre el fenotipo de estos linfocitos. Por lo tanto, es necesaria más investigación para dilucidar en que tipos tumorales es más conveniente su uso<sup>175,180</sup>.

### 3.3.3.-Linfocitos T específicos para virus (VST)

El uso de linfocitos T específicos para antígenos virales había generado respuestas beneficiosas a la hora de combatir infecciones virales. En estos ensayos clínicos, se observó una sintomatología de GvHD atenuada o inexistente, asociada a la especificidad de los linfocitos T infundidos hacia antígenos virales. De esta forma, se estableció que el uso de linfocitos VST era seguro en un contexto de trasplante alogénico<sup>181,182</sup>. Se procedió a validar el uso de linfocitos VST en terapia CAR-T. Tanto a nivel preclínico como en ensayos clínicos se ha demostrado que los linfocitos CAR-T generados a partir de VST son seguros y además son capaces de generar una respuesta efectiva contra el antígeno tumoral hacia el que se han redirigido. También se ha descrito que estos linfocitos mantienen su reactividad contra antígenos virales, pudiendo así proporcionar un efecto de protección frente a enfermedades infecciosas, que suelen ser recurrentes en pacientes sometidos a una terapia CAR-T<sup>183,184</sup>.

Por el contrario, el uso de estos VST-CAR requiere de un proceso de manufactura más largo de lo habitual<sup>183</sup>. La principal propuesta para el uso de esta terapia va ligada a la creación de un biobanco generado a partir de donantes con diferentes haplotipos de HLA, lo que requiere de la capacidad de tener una gran infraestructura que permita el almacenamiento de una gran cantidad de productos. Además, en los diferentes ensayos se ha visto que la persistencia en sangre de los linfocitos VST es limitada en el tiempo debido al rechazo mediado por el sistema inmune del paciente en aquellos casos en que hay disparidad en los haplotipos de HLA<sup>185</sup>.

### 3.3.4.- Subpoblaciones de linfocitos T de memoria

Durante el proceso de maduración de los linfocitos T *naïve* hacia un fenotipo efector, se generan diferentes subpoblaciones de linfocitos que comúnmente reciben el nombre de linfocitos de memoria.

Se ha descrito que los linfocitos T de memoria son menos propensos a producir una respuesta alogénica. Esto se debe a que presentan un repertorio de TCR menos complejo que los linfocitos T *naïve*, lo que reduce la probabilidad de responder a un

estímulo alogénico. Algunos grupos de investigación han demostrado que, aunque dentro de este conjunto de linfocitos T de memoria hay algunos linfocitos aloreactivos, estos son incapaces de mantener una respuesta duradera durante el trasplante. Dentro de este contexto, se han descrito métodos para generar linfocitos CAR-T a partir del conjunto de linfocitos T de memoria, demostrando que estos mantienen una buena capacidad de lisis frente a las células diana y una menor aloreactividad<sup>186-189</sup>.

El principal inconveniente es durante el proceso de expansión *ex vivo*, donde se genera un alto porcentaje de linfocitos de memoria efectora, que tienen una menor persistencia que los linfocitos *naïve* o de memoria central, lo que puede llevar a comprometer la respuesta de la terapia a largo plazo<sup>190,191</sup>.

### 3.3.5.- Células CAR-T derivadas de iPSC

El uso de células iPSC tiene como gran ventaja su alta capacidad de proliferación y autorrenovación. Este tipo de estrategia permitiría la generación de biobancos con iPSC con diferentes haplotipos de HLA. Si generásemos iPSC a partir de progenitores hematopoyéticos, al diferenciarlos a linfocitos T tendríamos un repertorio de TCR amplio, que podría dar lugar a aloreactividad. Por ello, normalmente se aísla un clon de linfocito T maduro con un TCR de especificidad conocida para generar una colonia de iPSC a partir de este. Usualmente, esta especificidad suele ser contra un neoantígeno tumoral. Otra estrategia posible, es realizar un *knock-out* en el locus TRAC que codifica para la cadena alfa del TCR. Cualquiera de estas dos vías evitaría la aparición de una respuesta alogénica indeseada<sup>192,193</sup>.

Las estrategias para generar linfocitos CAR-T a partir de estas iPSC pueden ser dos: modificar genéticamente la colonia de iPSC, o modificar los linfocitos T re-diferenciados<sup>194,195</sup>. Ambas estrategias han dado buenos resultados en estudios preclínicos, pero necesitan de una mayor dosis de linfocitos CAR-T para conseguir el control del tumor. Esto podría deberse a que la generación de linfocitos T a partir de iPSC tan solo genera linfocitos CD8+, y que las características de estos son más propias de los linfocitos asociados a la inmunidad innata. Sin embargo, a través de la modulación de la señalización proveniente del TCR o el CAR, se pueden generar linfocitos con un fenotipo asociado a la inmunidad adaptativa<sup>196</sup>.

Los principales inconvenientes asociados a esta estrategia vienen derivados de la complejidad técnica de trabajar con cultivos de iPSC, el sobrecoste añadido de los materiales necesarios para la generación de iPSC y la diferenciación de estas a linfocitos T. Además, el uso de iPSC requeriría de un control más exhaustivo para evitar la presencia de células no diferenciadas en el producto terapéutico final<sup>197,198</sup>.

### 3.3.6.-Linfocitos T $\alpha\beta$ modificados genéticamente

Los linfocitos  $\alpha\beta$  han sido la principal fuente celular para terapia CAR-T. La alta disponibilidad de estos en sangre periférica y el amplio conocimiento en su cultivo y expansión *ex vivo* permiten obtener una gran cantidad de células para el tratamiento CAR. Las principales estrategias para generar linfocitos T que no causen una respuesta alogénica se basa en impedir la expresión del TCR en la superficie del linfocito T, a través del silenciamiento o la interrupción de la expresión de los *loci* TRAC o TRBC<sup>199</sup>.

El uso de estos linfocitos T modificados genéticamente para evitar la respuesta alogénica supone una ventaja sobre las fuentes alternativas, ya que hay una amplia disponibilidad de linfocitos T  $\alpha\beta$  de sangre periférica. Además, estos linfocitos presentan la ventaja de ser capaces de generar memoria inmunológica, y no dependen de protocolos de expansión más duraderos donde se generan un mayor número de linfocitos con fenotipo efector<sup>199,200</sup>.

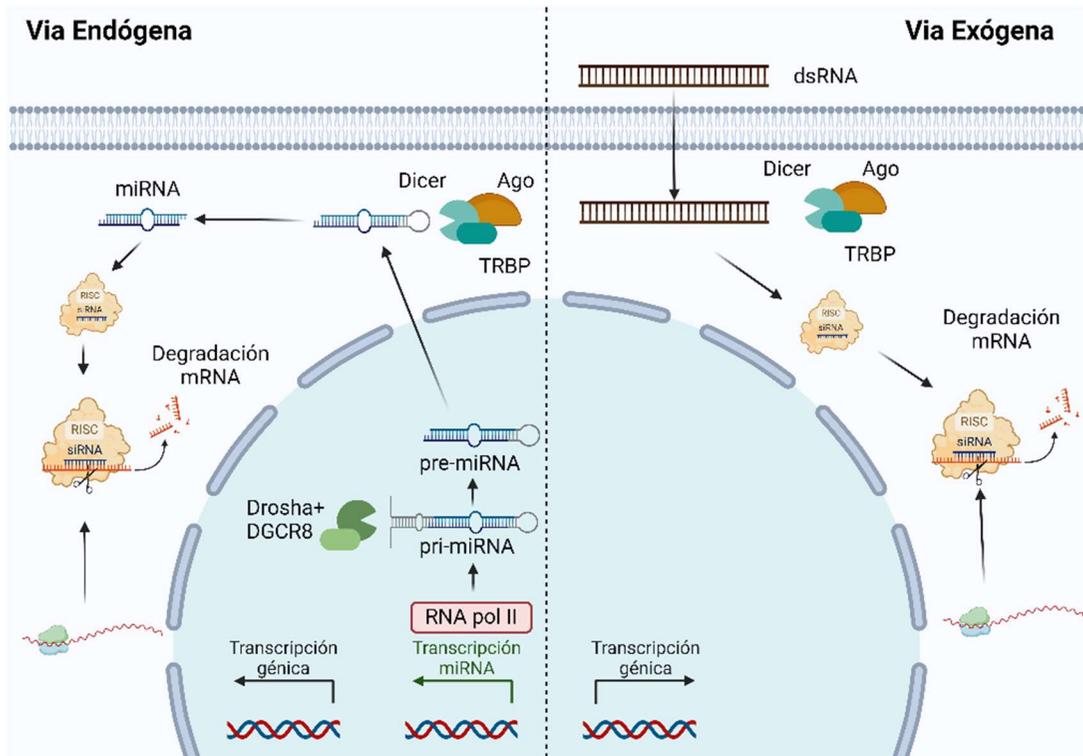
Las principales estrategias de modificación de linfocitos  $\alpha\beta$  se basan en el *knock-out* de genes a través de herramientas de edición génica, aunque también se han desarrollado estrategias de silenciamiento a través de RNA de interferencia.

#### 3.3.6.1.- Estrategias de silenciamiento

El silenciamiento de genes es un proceso fisiológico que regula la expresión de proteínas a nivel del RNA mensajero. Este proceso fue descrito por primera vez en animales en la década de los 90, y se observó que el agente que mediaba esta represión de la expresión génica era una molécula de RNA pequeña de doble cadena. A partir de estos descubrimientos se definieron los mecanismos moleculares detrás del silenciamiento génico mediado por estos RNA de interferencia, y se descubrió que estas moléculas también estaban codificadas en el genoma celular en lo que conocemos como micro RNA (miRNA). Hay dos vías principales para la generación de RNA de interferencia (**Figura 9**): la vía endógena, basada en los microRNA fisiológicos, y la vía exógena, basada en la administración de precursores de estos iRNA cómo dsRNA o siRNA<sup>201,202</sup>.

•Vía endógena: La transcripción da lugar a los micro RNA primarios (pri-miRNA) en el núcleo. Estos son procesados en el núcleo a través de la actividad de DROSHA para generar pre-miRNA. Los pre-miRNA son posteriormente exportados al citosol, donde son reconocidos por las proteínas TRBP, Dicer y Argonauta, generándose el *Risc loading complex* (RLC). Este RLC posteriormente descarta una de las hebras de la cadena de dsRNA, generándose el complejo de silenciamiento por RNA (RISC) maduro, el cuál mediará el silenciamiento del mRNA específico.

•Vía exógena: Las moléculas de siRNA o dsRNA sintéticas son administradas en el citosol, donde rápidamente son reconocidas por la proteína Dicer, TRBP y Argonauta, formando el complejo RLC, y posteriormente el complejo RISC maduro que podrá mediar el silenciamiento de mRNA específico.



**Figura 9 Representación esquemática del proceso de silenciamiento a través de RNA de interferencia.** Adaptado de: A Hernández-Soto, 2021

Pese a que este tipo de tecnología es muy adecuada para mediar el bloqueo de la expresión de genes de interés, se ha descrito que su aplicación comporta la aparición de efectos no deseados o subóptimos:

•Silenciamiento off-target: En algunos casos la secuencia de nucleótidos diseñada para mediar el silenciamiento de algunos genes puede estar compartida parcialmente por otros mRNA diferentes al de interés. Asimismo, debido a que Argonauta ha de seleccionar una de las dos cadenas que forman el RNA de interferencia, puede seleccionar la hebra de RNA no deseada, pudiendo actuar sobre otros mRNA. A través de estos mecanismos podría darse el silenciamiento de genes de manera no específica, pudiendo afectar deletéreamente a la célula modificada o mediar un efecto oncogénico<sup>203-205</sup>.

•Silenciamiento parcial o incompleto: En múltiples estudios realizados a lo largo del tiempo se ha descrito que no todos los iRNA son capaces de mediar un silenciamiento completo del mRNA contra el que están dirigidos, manteniéndose una expresión residual de la proteína que se pretende silenciar<sup>206</sup>.

•Dificultad a la hora de conseguir el silenciamiento de múltiples genes: Otra de las limitaciones de esta tecnología es la dificultad que se ha descrito a la hora de mediar el silenciamiento de múltiples genes a la vez. Pese a que a nivel fisiológico los pri-miRNA contienen múltiples secuencias de silenciamiento, el diseño de pri-miRNA transgénicos para silenciar genes de interés no ha obtenido muy buenos resultados<sup>207</sup>. Aunque hay algunos grupos de investigación que recientemente han conseguido generar plataformas de pri-miRNA que son capaces de silenciar múltiples genes a la vez en linfocitos T<sup>208</sup>.

Pese a que esta tecnología de silenciamiento se conoce desde hace mucho tiempo, su uso a la hora de generar linfocitos CAR-T  $\alpha\beta$  modificados para impedir la expresión de moléculas como el complejo del TCR o HLA no ha sido ampliamente explorada. De hecho, en la actualidad tan sólo hay un ensayo clínico en marcha que esté utilizando linfocitos alogénicos modificados a través de esta estrategia.<sup>209</sup> Esto posiblemente sea deba a la aparición de tecnologías de edición génica que presentan ciertas ventajas sobre el silenciamiento de genes.

### 3.3.6.2.- Estrategias de edición génica

Las estrategias de edición génica median su efecto sobre la expresión génica alterando directamente la secuencia del ácido desoxirribonucleico (DNA). A pesar de que en la actualidad se han desarrollado múltiples tecnologías basadas en nucleasas para este propósito, su mecanismo es muy similar. De forma resumida, las diferentes nucleasas están compuestas por dos dominios: un dominio guía, que es capaz de dirigir a la nucleasa hacia una secuencia de DNA específica, y un dominio catalítico, que es capaz de mediar un corte de doble cadena sobre la hebra de DNA, produciendo una rotura de doble cadena (DSB). La generación de un DSB en el DNA activa los mecanismos de reparación del DNA propios de la célula, que son principalmente dos (**Figura 10**)<sup>210,211</sup>:

•Reparación dirigida por homología: El proceso de reparación por homología es un mecanismo complejo. Una vez se ha producido el DSB, ocurre una resección de 3' a 5' en las cadenas de DNA para dejar libres los extremos 3'OH. A continuación, la hebra de DNA busca un molde con homología, que en condiciones fisiológicas será la hebra complementaria del cromosoma homólogo, formándose un complejo sináptico, el

cual dará lugar a la invasión de la hebra y la formación de un bucle D. Una vez formado el bucle D, se podrá iniciar la síntesis de DNA en la cadena invasora, generándose un bucle D extendido.

A partir de este punto, encontramos dos opciones. La vía de síntesis dependiente de recocido (SDSA) en que la hebra invasora copia el molde del cromosoma homólogo, a continuación, se produce la disrupción del bucle D y la hebra invasora pasa a recocerse con su hebra complementaria original, sirviéndose mutuamente de molde.

La segunda vía de reparación es la conocida como Doble unión de Holliday (dHJ). Esta vía prosigue de la siguiente manera: una vez se forma el bucle D extendido, la otra hebra del cromosoma dañado produce una segunda invasión, y utiliza también la información del cromosoma homólogo como molde. Una vez completada la síntesis de DNA, se da la ligación de las hebras rotas, formándose la estructura de dHJ. En base a la resolución de esta estructura, podrá producirse o no una recombinación homóloga a nivel somático<sup>212</sup>.

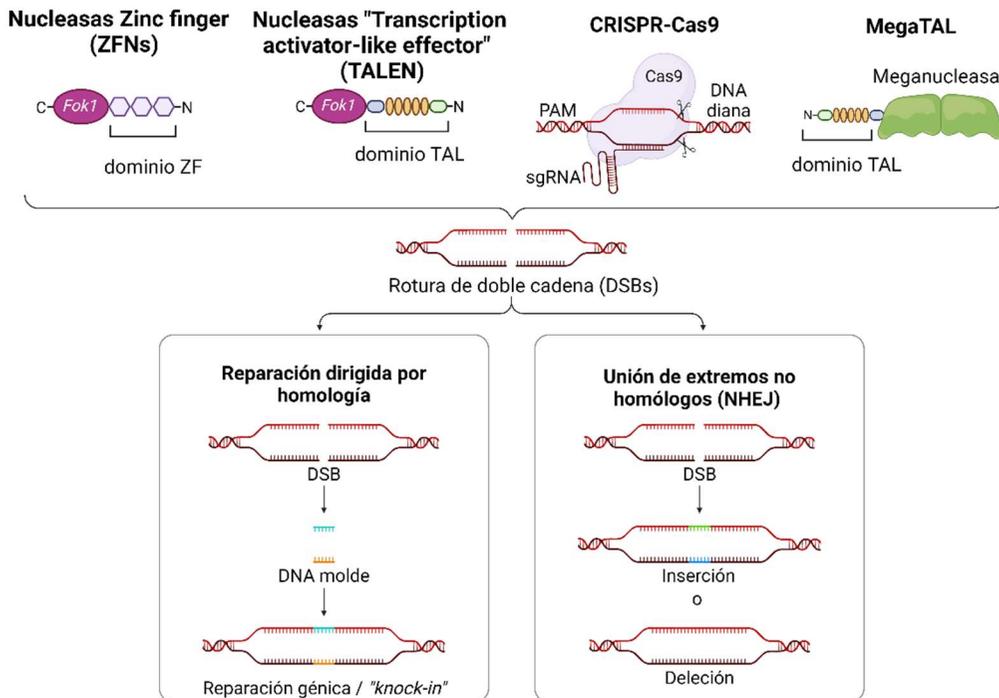
•Unión de extremos no homólogos (NHEJ): Este proceso de reparación es independiente de un molde de homología, siendo más propenso a la introducción de mutaciones durante la reparación de la secuencia. El mecanismo de NHEJ se da en tres pasos. Primero se da el reconocimiento del DSB, dándose la unión del complejo proteico formado por Ku70/80 a los extremos libres de la cadena de DNA. La unión de este complejo sirve como andamiaje para la unión de las proteínas que mediarán los siguientes pasos. A continuación, se da el procesamiento de los extremos libres a través de diferentes enzimas con actividad exonucleasa para generar extremos cohesivos, para dar lugar al último paso del proceso, que es la ligación de los extremos libres<sup>213</sup>.

La inducción de estos mecanismos de reparación permite la aplicación de la edición génica utilizando uno u otro mecanismo de reparación en base al efecto que se busca. Si se busca mediar la disrupción de un gen para evitar su expresión (*knock-out*), normalmente, tan sólo se transfecta la célula que se quiere editar con la nucleasa de elección. Esta nucleasa mediará su corte, y a través de la reparación vía NHEJ, la introducción de pequeñas mutaciones indels durante el paso de formación de los extremos cohesivos será suficiente para mediar esta disrupción<sup>214</sup>.

Por otra parte, si se busca insertar un gen de interés para que este sea expresado (*knock-in*), se transfecta la nucleasa de elección junto a un DNA molde que contiene la secuencia que se quiere insertar en el genoma. Esta estrategia requiere de la reparación dirigida por homología para que el DNA molde que contiene el transgén pueda recombinar con el DNA genómico e integrarse.<sup>215</sup> Esta estrategia de *knock-in* también puede producirse a través de vías independientes de la reparación por

homología, las cuales permiten la inserción de transgenes con una longitud superior a 1kb<sup>216</sup>.

Hoy en día se han desarrollado diferentes tipos de nucleasas que permiten mediar cortes de doble cadena en secuencias específicas de DNA:



**Figura 10 Representación esquemática de las principales tecnologías utilizadas para mediar edición génica en linfocitos T. Adaptado a partir de: Hussain, A, 2021**

•**Nucleasas zinc finger (ZFN):** Son proteínas quiméricas con dos módulos principales. El módulo de reconocimiento del DNA está basado en los motivos estructurales *zinc-finger*. Estos son motivos estructurales con capacidad para unirse a 3pb concretos<sup>217</sup>. De esta manera, la combinación de diferentes dominios *zinc-finger* permiten generar un multímero capaz de reconocer secuencias nucleotídicas concretas de una longitud determinada, aunque en muchos casos es difícil obtener una combinación que dé lugar a estructuras estables y con la especificidad deseada<sup>218</sup>.

El módulo catalítico está basado en la endonucleasa FokI, la cual no tiene una secuencia diana de corte. Esta nucleasa necesita dimerizar para mediar su función catalítica, la cual generará un corte de doble cadena<sup>219</sup>.

El funcionamiento de estas ZFN se basa en generar dos proteínas ZFN con especificidad para dos secuencias nucleotídicas adyacentes. De esta manera, cuando se da la unión específica al DNA, los dominios catalíticos de ambas ZFN podrán dimerizar debido a su proximidad y así mediar un corte de doble cadena en una secuencia concreta del DNA<sup>218</sup>.

•Nucleasas efectoras *Transcription activator-like (TALEN)*: El módulo de reconocimiento del DNA está basado en la familia de las proteínas TAL. Las proteínas de la familia TAL son proteínas de origen bacteriano que pueden entrar en el núcleo de las células y unirse al DNA, desencadenando un cambio en el patrón de la expresión génica<sup>220</sup>.

Están formadas por un dominio de localización intranuclear, un dominio de unión al DNA, y un dominio con actividad de activación transcripcional. La especificidad del dominio de unión al DNA a un nucleótido concreto venía dada por la divergencia en los residuos 12-13 del dominio de unión. Con esta información se propuso que el diseño de diferentes repeticiones de TAL podría ser utilizado para dirigir estas proteínas a secuencias de DNA específicas<sup>221</sup>.

La fusión de un dominio TAL para una secuencia específica a la endonucleasa FokI dota a estas de actividad catalítica. Como la actividad de esta endonucleasa depende de la formación de un dímero, se necesitarán dos moléculas TALEN para mediar el corte en la cadena de DNA<sup>222</sup>.

•MegaTAL: Surgen a partir de las meganucleasas, estas enzimas tienen la capacidad de unirse a secuencias específicas de DNA y mediar un DSB. Pese a su posible uso para edición génica, la estructura de estas meganucleasas, en las que la región de unión al DNA y la región enzimática están integradas, hacía que resultase complicado mediar la redirección de la actividad nucleasa hacia genes de interés<sup>223</sup>.

Por ello, en estudios posteriores se originaron las nucleasas megaTAL. Estas presentan un dominio TAL que dirige la endonucleasa hacia una región específica dentro del genoma, y un dominio meganucleasa el cuál posee la capacidad de unirse al DNA genómico y mediar un DSB sobre una secuencia específica. El uso de meganucleasas como dominio catalítico en comparación al dominio FokI utilizado en la tecnología TALEN, hace que esta plataforma sea más restrictiva a la hora de mediar un corte sobre el DNA, y por tanto sean necesarias menos repeticiones TAL para dirigir la nucleasa a la secuencia de interés, simplificando así su diseño<sup>224</sup>.

•Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciada (CRISPR):

Este sistema de edición génica se basa en el uso de una estrategia de inmunidad adaptativa de arqueas y bacterias <sup>225</sup>. La principal diferencia de este sistema con los anteriores es que la interacción con la secuencia de DNA específica es a través de interacciones de Watson y Crick, en vez de interacciones proteína-DNA. Esto hace que la especificidad y el diseño del módulo de reconocimiento del DNA sea mucho más sencilla. El funcionamiento de este sistema se basa en dos moléculas de RNA, el crRNA y el trcrRNA, estas moléculas de RNA forman un dúplex que recibe el nombre de sgRNA. La formación del complejo sgRNA con la endonucleasa Cas9, permite dirigir esta endonucleasa hacia una región concreta del genoma. Una vez allí, la endonucleasa mediará un corte de doble cadena sobre la secuencia PAM específica del subtipo de Cas9 utilizado <sup>226</sup>.

### **3.3.6.2.1.-Limitaciones e inconvenientes de las tecnologías de edición génica**

A pesar de la gran efectividad de las diferentes estrategias de edición génica, se han descrito ciertos inconvenientes y efectos no deseados, que pueden limitar su aplicabilidad a nivel clínico:

•Edición no deseada: Varios estudios han demostrado que se pueden producir cortes no deseados en otras regiones del genoma de forma inespecífica. Este fenómeno puede ser debido a que haya una secuencia idéntica a la de reconocimiento o a que el dominio de reconocimiento pueda interactuar con secuencias de DNA con un alto grado de similitud a la secuencia para la que han sido diseñados. Debido a este efecto, podrían generarse mutaciones no deseadas en otras regiones del genoma, entre de las cuales pueden encontrarse mutaciones puntuales, inserciones, deleciones e incluso translocaciones <sup>227</sup>.

Cuando la aparición de estas mutaciones se produce en genes vitales para la célula, se habla de genotoxicidad. Esta genotoxicidad puede afectar a la función de las células modificadas o dar lugar a un proceso de transformación celular, con la consiguiente formación de tumores, si los elementos modificados de forma no deseada son genes supresores de tumores o protooncogenes <sup>228,229</sup>.

Además, se ha descrito que el uso de estas nucleasas que inducen DSB genera una alta toxicidad celular. Cuando se dan múltiples cortes de doble cadena en el genoma, se induce la activación de mecanismos protectores frente a la oncogénesis, como la

activación de la proteína TP53, que es capaz de inducir la apoptosis celular debido a daños en el genoma<sup>224,230-232</sup>.

**•Inmunogenicidad:** El uso de células modificadas con tecnologías de edición génica puede generar una respuesta inmunológica por parte del huésped. Este fenómeno se produce porque las endonucleasas o bien los vectores utilizados para en este tipo de tecnología proceden de microorganismos como bacterias o virus. Esta respuesta inmunogénica puede mediar la muerte de las células modificadas, eliminando así el posible efecto terapéutico.

Dentro de los diferentes sistemas de edición génica, la inmunogenicidad es más prominente en el sistema CRISPR-Cas9 porque la proteína Cas9 procede de una bacteria patógena para el ser humano. Mientras que los sistemas basados en TALs no generan tanta inmunogenicidad porque el microorganismo del cuál proceden no es un patógeno. Finalmente, hay que destacar que el sistema de ZFN no genera inmunogenicidad porque es un sistema basado en una proteína humana<sup>233,234</sup>.

En cuanto a los vectores utilizados, aquellos basados en adenovirus, retrovirus o virus adenoasociados generan una respuesta inmunogénica. Mientras que los vectores basados en sistemas físicos o bien en nanopartículas no presentan inmunogenicidad<sup>235,236</sup>.

**•On-target toxicity:** Este fenómeno ha sido descrito para el sistema CRISPR-Cas9. Algunos investigadores demostraron que, en algunos casos, los cortes producidos por esta endonucleasa en la secuencia a la que iban dirigidas generaban grandes deleciones. Además, también se especula sobre la aparición de otro tipo de mutaciones que podían dar lugar a genotoxicidad, como inversiones o translocaciones<sup>237,238</sup>.

Hoy en día ya se han descrito una gran cantidad de estudios que intentan solventar estas limitaciones, bien sea utilizando nucleasas con actividad nickasa, que generan cortes en una única hebra, el uso de nuevas vías administración para producir una expresión transiente de las nucleasas que evite la inmunogenicidad y la aparición de cortes no deseados. Aunque son estudios novedosos, y necesitan de más investigación para dilucidar si realmente son capaces de realizar una edición génica sin efectos no deseados<sup>239,240</sup>.

Debido a estos inconvenientes compartidos por la mayoría de las estrategias de edición génica. La aplicación de este tipo de tecnología se ha visto frenada por los principales organismos competentes debido a la posible aparición de efectos secundarios graves. Es por ello, que pese a que estas técnicas llevan utilizándose durante mucho tiempo hay muy pocas terapias aprobadas.

### 3.3.6.3.- Estrategias de retención de proteínas

Debido a la dificultad y a los efectos no deseados que se producen en las estrategias de silenciamiento o de edición génica, algunos investigadores han optado por el diseño de nuevas estrategias que interfieran con la expresión de las moléculas implicadas en la respuesta alogénica, utilizando sistemas de retención de proteínas.

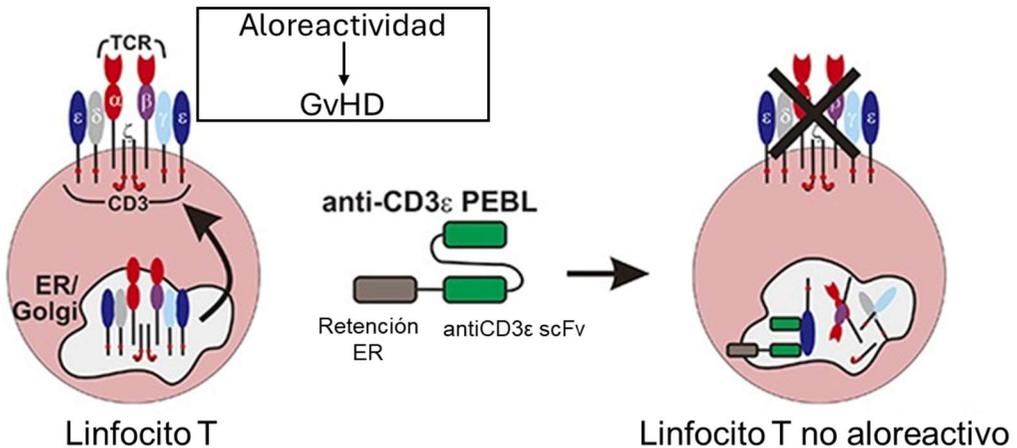
Estos sistemas de retención de proteínas se basan en la generación de anticuerpos intracitoplasmáticos o intracuerpos. De forma natural, los anticuerpos median su efecto en el medio extracelular, mientras que los intracuerpos median su efecto a nivel intracelular. La generación de esta tecnología de intracuerpos fue descrita en la década de los 90. Esta estrategia se basa en la expresión de un anticuerpo o un scFv unido a una señal de localización intracelular. De esta manera, se puede bloquear o interferir con la función de una proteína concreta y realizar estudios sobre su implicación en la fisiología celular. Además, también se ha propuesto el uso de intracuerpos con finalidades terapéuticas<sup>241-243</sup>.

Se han generado intracuerpos dirigidos contra diferentes proteínas que se secretan a través de la vía de secreción general de las células. Para ello, se fusiona a la región del scFv una señal peptídica con un motivo KKXX o KDEL<sup>244,245</sup>. La expresión de estos motivos permite que los intracuerpos sean reconocidos por el receptor de proteínas retenidas en el lumen del RE (Erd). El reconocimiento de los intracuerpos por las proteínas Erd permite la entrada de estos en la vía de transporte retrograda desde el AG hacia el RE, mediada por las vesículas recubiertas de COP-I, evitando así su secreción hacia la superficie. A través de este mecanismo, los intracuerpos pueden unir su proteína diana y evitar así su secreción o expresión en la superficie celular<sup>243</sup>.

La aplicación de esta tecnología para generar una terapia CAR-T a partir de linfocitos T alogénicos fue descrita por el grupo del Dr. Campana. En esta investigación, se demuestra que la expresión de un intracuerpo dirigido a la proteína CD3ε es capaz de bloquear la expresión de esta proteína en la superficie de los linfocitos T, manteniéndola retenida en el sistema vesicular del RE-AG (**Figura 11**). Además, debido a la importancia de esta molécula en el ensamblaje del complejo del TCR<sup>246,247</sup>, la expresión de este intracuerpo se manifiesta con una disminución de este complejo en la superficie de los linfocitos modificados. El efecto sobre la expresión de estas moléculas se corresponde con la desaparición de la capacidad de los linfocitos modificados de mediar una respuesta alogénica.

En este estudio también se demuestra que la expresión de este intracuerpo puede combinarse con la expresión de un CAR en un único transgén a través del uso de un

dominio autoescindible T2A. Además, muestran como esta estrategia no presenta diferencias funcionales en la actividad del CAR en modelos *in vitro* o *in vivo*<sup>248</sup>.



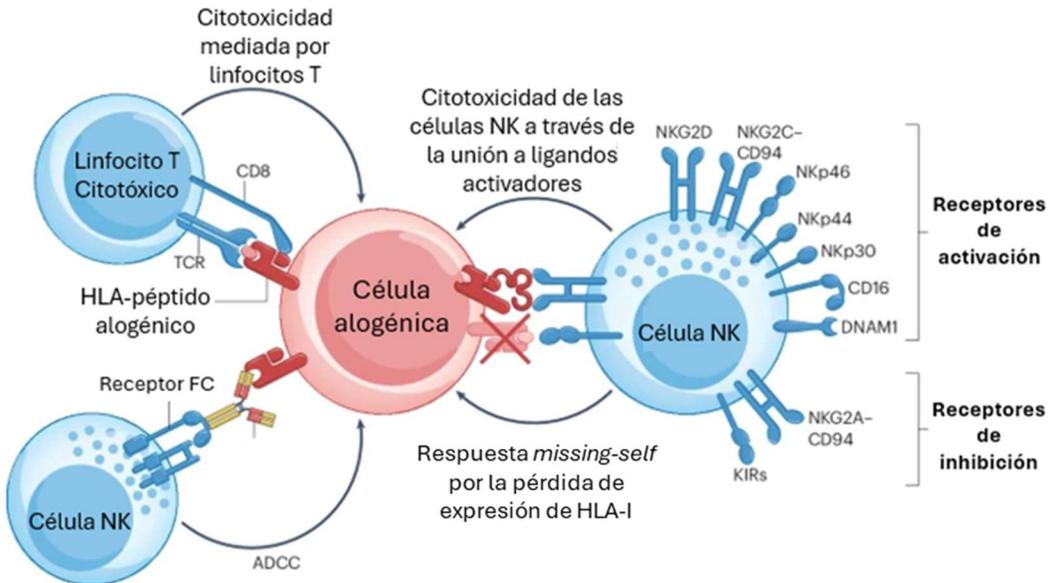
**Figura 11** Representación esquemática de la estrategia de retención de CD3ε en el Retículo Endoplasmático mediada por un intracuerpo. Adaptado de : T Kamiya, 2018

Uno de los puntos fuertes de esta estrategia es que la metodología de manufactura sería muy similar al estándar actual para la producción de terapias CAR-T autólogas. Por el contrario, la aplicación de las estrategias de edición génica en la generación de linfocitos CAR-T implica una mayor complejidad y dificultad técnica en la metodología de manufactura, pudiendo llevar a un mayor coste en la producción, o un mayor porcentaje de producciones fallidas<sup>248</sup>.

### 3.4.-Estrategias para evitar el rechazo alógeno

Pese a que todas las estrategias comentadas en el apartado anterior se han descrito como seguras para evitar la aparición de GVHD, estas siguen siendo susceptibles al rechazo alógeno mediado por el sistema inmune del paciente, en tanto que todas estas fuentes de células siguen expresando en su superficie moléculas de HLA. Por ello, algunos estudios intentan mediar una disminución o evitar la expresión de estas moléculas, para intentar incrementar el tiempo de vida de las terapias CAR alógenas<sup>137</sup>. La reducción de la expresión de estas moléculas hace que los linfocitos T alógenos pasen a ser reconocidos por las células NK del paciente. Esto es debido a que las células NK son capaces de reconocer las células que no expresan moléculas de HLA como extrañas, mediando su lisis<sup>249</sup>. Pese a ello, que el rechazo sea mediado

por células NK en vez de por linfocitos T supone una ventaja, en tanto que la capacidad de las células NK para generar memoria inmunológica es limitada (**Figura 12**)<sup>250</sup>.



**Figura 12** Representación esquemática de los principales mecanismos de reconocimiento por parte de las células NK hacia células alogénicas modificadas para no expresar HLA-I. Adaptado de: Martín KE, 2024

Dentro de las estrategias empleadas para evitar el rechazo de linfocitos alogénicos encontramos las siguientes.

### 3.4.1.-Uso de tecnologías de silenciamiento o edición génica

A través del uso de estas tecnologías, diferentes grupos han llevado a cabo una disminución de la expresión en superficie de las moléculas HLA. Este efecto se ha conseguido principalmente a través del silenciamiento o el *knock-out* de genes que juegan un papel clave en la presentación antigénica. En el caso de las moléculas de HLA de clase I, uno de los genes sobre el que mediar este efecto es el gen de la beta 2 microglobulina. Esto es debido a que la beta 2 microglobulina es necesaria para el ensamblaje de los tres tipos de HLA de clase I, de esta manera, modificando un único *locus*, se impide la expresión de las tres moléculas a la vez<sup>251,252</sup>.

Para mediar este efecto sobre las moléculas de HLA de clase II, el principal gen diana es el del transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (*CIITA*).

La expresión de *CIITA* se da en linfocitos T activados, y es el regulador de la expresión de las moléculas de clase II. De esta manera, haciendo una disrupción sobre este, se consigue evitar la expresión de todos los tipos de moléculas de HLA de clase II en la superficie<sup>253,254</sup>.

Los principales inconvenientes de estas estrategias se corresponderían con los mismos que hemos comentado en el apartado anterior en cuanto a la edición o el silenciamiento *off-target*, así como la genotoxicidad asociada a los sistemas de edición génica.

### **3.4.2.-Depleción del sistema inmune del paciente**

Otra de las vías para evitar el rechazo inmunológico es eliminar el sistema inmunitario del paciente. Esto puede ser mediado de diferentes formas:

•Uso de linfocitos T resistentes a agentes quimioterapéuticos: En un estudio realizado previamente, se propuso generar linfocitos T modificados genéticamente para evitar la expresión de la molécula CD52. Esta molécula de superficie es expresada por la mayor parte de las células del sistema inmunitario. De hecho, el anticuerpo monoclonal alemtuzumab, dirigido contra esta molécula, es utilizado como un agente inmunoterapéutico. En este estudio demostraron que el *knock-out* de CD52 en los linfocitos CAR-T los hacía resistentes al tratamiento con alemtuzumab. De esta manera, se propone que el uso de alemtuzumab podría utilizarse para eliminar el sistema inmune del paciente, favoreciendo así el injerto de los linfocitos CAR-T<sup>255</sup>.

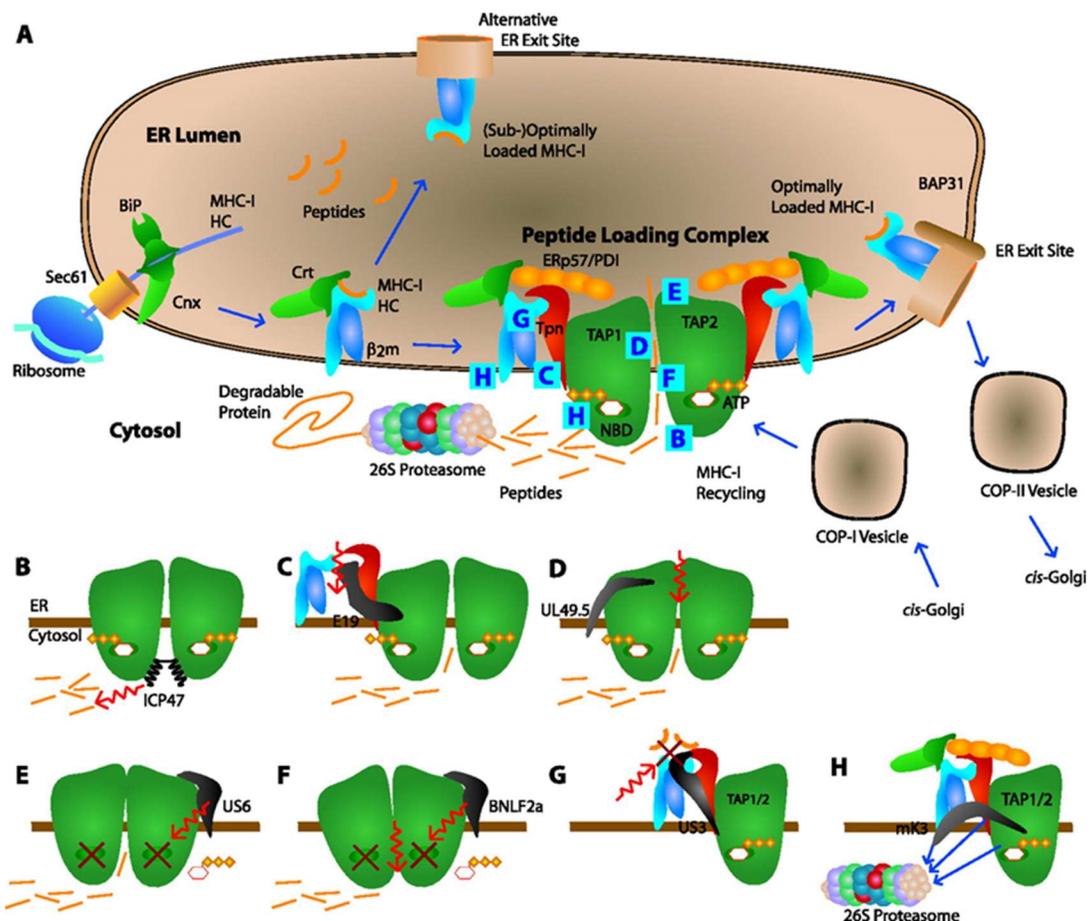
•Linfodepleción activa: Esta aproximación se basa en dotar a los linfocitos CAR-T alogénicos con un constructo que les permita eliminar a los linfocitos T aloreactivos. En este caso, este constructo quimérico fusiona el dominio extracelular de 4-1BBL a un dominio de señalización intracelular basado en CD3ζ. En este estudio, demuestran que esta molécula quimérica es capaz de interactuar con las moléculas de 4-1BB expresadas por los linfocitos T aloreactivos activados, y eliminarlos, consiguiendo de esta manera evitar el rechazo en un contexto alogénico<sup>256</sup>.

### **3.4.3.-Uso de inmunoevasinas virales**

Debido a la adaptación evolutiva entre huésped y agentes infecciosos que se ha dado a lo largo del tiempo, los virus han sido capaces de obtener mecanismos para evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune de las células que han infectado. Estas estrategias de evasión se basan en la expresión de una serie de proteínas, que han sido

denominadas como inmunoevasinas. La función de estas inmunoevasinas es interferir con la presentación de antígenos, para impedir la expresión en superficie de moléculas de HLA que presenten antígenos víricos. Cada virus ha sido capaz de desarrollar una o más inmunoevasinas, que actúan sobre diferentes pasos o proteínas del proceso de presentación antigénica (**Figura 13**)<sup>257–259</sup>.

Pese a que existes estudios *in vitro* en que se ha descrito como la expresión transgénica de inmunoevasinas en células humanas es capaz de disminuir el reconocimiento por parte del sistema inmune, no ha sido hasta hace muy poco que esta estrategia se ha probado en terapias CAR-T. El único estudio publicado hasta la fecha se ha descrito como la expresión de estas moléculas es capaz de disminuir la inmunogenicidad de los linfocitos CAR-T, tanto en un contexto autólogo como alogénico<sup>260</sup>.



**Figura 13** Representación esquemática del efecto de diferentes inmunoevasinas sobre la presentación antigénica a nivel molecular. **A.** Representación esquemática de la presentación antigénica a nivel molecular. **B-H.** Representación del mecanismo de acción de diferentes inmunoevasinas para inhibir la presentación antigénica de clase I.. Extraído de: Røder G,2008

# **Hipótesis y Objetivos**



El uso de linfocitos T de donantes para la inmunoterapia celular tiene en el rechazo por alogenicidad la principal limitación. En este sentido mientras que la reducción en la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I en linfocitos T alogénicos permite evitar su rechazo por parte del sistema inmune del paciente (un mecanismo dependiente del reconocimiento de moléculas de HLA-I exógenas), la de las moléculas del complejo del Receptor de Células T (TCR) en la superficie de los linfocitos T alogénicos reduce o evita la enfermedad del injerto contra el receptor, debido a que estos linfocitos no podrán reconocer las moléculas de HLA del paciente. Este trabajo se centra en encontrar un método alternativo al más habitual (la edición génica) que permita conseguir también estos efectos.

En este sentido nuestra hipótesis fue que si expresásemos en linfocitos T humanos una proteína quimérica basada en un fragmento variable de un anticuerpo en formato de cadena única (scFv) dirigido contra la proteína CD3 $\epsilon$ , fusionado a una inmunoevasina residente del RE, esta podría mediar el doble mecanismo de reducción o eliminación del aloreconocimiento: por una parte, la inmunoevasina interferiría en el proceso de formación de moléculas maduras de HLA-I, disminuyendo su expresión en superficie y por otra parte, la fusión de la inmunoevasina al scFv dirigido contra CD3 $\epsilon$  permite generar un intracuerpo que a su vez media la retención de CD3 $\epsilon$  dentro del Retículo Endoplasmático, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de esta molécula, y el correcto ensamblaje del complejo del TCR, disminuyéndose su expresión en la membrana del linfocito T.

Así podemos hipotetizar también que la expresión de esta proteína quimérica que combina una inmunoevasina con un scFv anti-CD3 $\epsilon$  permite, por tanto, un uso seguro de linfocitos T de donante para la generación de terapias CAR-T.

Para evaluar si este planteamiento puede acompañar una terapia CART, hipotetizamos que el desarrollo de una terapia CAR-T alogénica dirigida contra la proteína S del virus SARS-CoV-2 para redirigir a los linfocitos T para que reconozcan y eliminen células infectadas, pudiendo ayudar así a resolver la infección en estadios muy iniciales en individuos inmunocomprometidos.

De esta manera, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido establecer una plataforma que permita la generación de linfocitos T con una expresión disminuida de CD3 y HLA-I para su uso alogénico en terapias celulares CAR-T (*off-the-shelf*), y en

concreto para su uso para una terapia dirigida contra SARS-CoV-2. Dentro de este objetivo principal podemos diferenciar objetivos específicos:

1.- Definir de un nuevo motivo de retención que:

- a) Permita conseguir la disminución en superficie de CD3 y moléculas de HLA-I.
- b) Incremente la eficacia disminuyendo tanto el EICR como el rechazo, en un contexto alogénico.

2.- Desarrollar una terapia CAR-T dirigida a SARS-CoV-2 para disponer de una opción en esta infección.

4.- Evaluar la eficacia de la combinación de la proteína quimérica y una molécula CAR para generar linfocitos CAR-T alogénicos *off-the-self*, listo para ser usado.

# **Materiales y métodos**



## 1.-PCR y electroforesis en gel de agarosa

Para obtener la secuencia de la región variable de la inmunoglobulina dirigida contra CD3ε del hibridoma 33-3A3, se procedió a realizar una extracción de RNA total utilizando el kit *RNeasy Plus Mini* (Qiagen, 50974134), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. A continuación, generamos el cDNA utilizando el kit *SensiFAST™ cDNA Synthesis* (EcoGen, BIO-65053).

A partir del cDNA, procedimos a realizar reacciones de PCR utilizando los cebadores del kit de secuenciación de Ig murinas (Novagen). Para las reacciones de PCR se utilizó la polimerasa de DNA Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs, M0530S), siguiendo el siguiente protocolo:

	Reacción 20µL	Concentración Final
Agua libre de nucleasas	Hasta 20µL	
10mM Cebador directo	1 µL	0,5 µM
10mM Cebador reverso	1 µL	0,5 µM
DNA molde	Variable	< 250 ng
10mM dNTPs	0,4 µL	200 µM
5X tampón Phusion HF	4 µL	1X
Polimerasa	0,2 µL	1U/reacción

	Temperatura	Tiempo
Denaturalización Inicial	94°C	60s
35 ciclos	94°C	60s
	60°C	60s
	72°C	120s
Extensión Final	72°C	6min
Mantenimiento	4°C	Indefinido

La preparación de geles de agarosa para la electroforesis se realizó para comprobar que combinación de cebadores había resultado en una amplificación del DNA molde. Para ello, se diluyeron 2mg de agarosa MS-8 (Condalab, 8065), en 200mL de tampón TRIS/Ácido Acético/EDTA (TAE) 1X (Bio-Rad, 1610743). La solución de TAE agarosa se calentó en el microondas durante 1-2 minutos hasta llevar a ebullición.

Posteriormente, se enfrió la solución y se añadieron 20µL de *SYBR Safe DNA Gel stain* (Invitrogen, S33102), y se dejó solidificar el gel en un molde adecuado. A continuación, se traspasó el gel de agarosa a una cubeta de electroforesis y se cargaron 20µL de las muestras,

previamente mezcladas con el tampón de carga (New England Biolabs, B7024A). En el gel de agarosa se cargó también una escalera de peso molecular de 1kb (ThermoFisher, 10787018).

Una vez cargadas todas las muestras, se corrió el gel durante 60 minutos a 120V. Transcurrido el tiempo, se reveló el gel con un transiluminador. Las combinaciones de cebadores en las que se apreciaban una banda se enviaron a secuenciar a una empresa externa (GeneWiz).

## **2.-Líneas celulares**

Para la realización de los experimentos se utilizaron las líneas celulares HEK293T, 293GS, A549, A549GS y Calu-3 que fueron cultivadas en medio *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM) (ThermoFisher, 10313021) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) (Merck, F9665) al 10% y una mezcla de penicilina/estreptomicina al 1% (ThermoFisher, 15140122). Además, se utilizaron las líneas ARP-1, U266 y Jurkat, que fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (ThermoFisher, 21875091) suplementado con FBS al 10% y una mezcla de penicilina/estreptomicina al 1%. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de 37°C y 5%CO<sub>2</sub>

Las líneas ARP-1 y U266 se utilizaron para los estudios de funcionalidad relacionados con el CAR ARI-0002h y su versión alogénica. Estas líneas son modelo de la enfermedad de mieloma múltiple, y expresan el antígeno BCMA contra el que va dirigido el scFv del CAR ARI-0002h.

Para el estudio de los CAR-T dirigidos contra SARS-CoV-2, se utilizaron las líneas HEK293T, 293GS, que derivan de células de riñón de embrión humano, mientras que las A549, A549GS y Calu-3 derivan de adenocarcinoma de pulmón.

Finalmente, las líneas HEK293T y Jurkat se utilizaron para la producción y titulación de los diferentes vectores lentivirales.

Todas las líneas se encontraban ya en el laboratorio y fueron adquiridas previamente en la *American Tissue Culture Collection* (ATCC) o bien cedidas amablemente por investigadores de otros grupos.

## **3.-Diseño y producción de plásmidos de interés**

Tanto la síntesis de las secuencias de interés, como la clonación por digestión y ligación de los diferentes plásmidos utilizados en esta tesis doctoral fueron realizados por una empresa externa (GenScript). Todos los plásmidos utilizados contenían un gen de resistencia a ampicilina y el promotor *Elongation Factor 1 $\alpha$*  (EF-1 $\alpha$ ).

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

Nombre del plásmido	Estrategia de clonaje
<b>pCCL-E19K_zsGreen</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-US3_zsGreen</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-US6_zsGreen</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-CD3US6_zsGreen</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-ARI-0002h</b>	Este plásmido ya había sido previamente sintetizado en el grupo de investigación
<b>pCCL-GLuc-Spike</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C8-BBz</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C8-28z</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-C8-BBz utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C10-BBz</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$ -ARI-0001 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C10-28z</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-C10-BBz utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C8-28U</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-CD3US6 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI

<b>pCCL-C8-BBU</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-CD3US6 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C10-28U</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-CD3US6 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI
<b>pCCL-C10-BBU</b>	La secuencia de interés fue sintetizada y clonada en el plásmido pCCL-CD3US6 utilizando las dianas de restricción MluI y BspEI

A medida que se obtuvieron los plásmidos, se transformaron bacterias competentes *E.Coli OneShot Stbl3* (Invitrogen, C737303) para hacer producciones de grandes cantidades de los diferentes plásmidos, siguiendo el siguiente protocolo:

#### Día 0

Se descongeló un vial de bacterias competentes y se les añadieron 200ng del plásmido. A continuación, se incubaron las bacterias en hielo (4°C) durante 30 minutos. Seguidamente, se realizó un choque térmico (42°C durante 45 segundos), y finalmente se volvieron a incubar en hielo durante 2 minutos.

Una vez realizado el choque térmico, se añadieron 250µL de medio SOC (Invitrogen, 15544034) y se incubaron las bacterias a 37°C en agitación a 225rpm durante 1h. Seguidamente, se sembraron 100µL de la suspensión de bacterias en una placa de selección de *Lurias' Broth* (LB) agar (Merck, 05040) con ampicilina (Merck, A9518), y se incubaron toda la noche a 37°C.

#### Día 1

Al día siguiente, se observó el crecimiento de colonias en la placa, y se inocularon diferentes colonias en diferentes tubos con 5 mL medio LB (Sigma-Aldrich, L1900) con Ampicilina. Estos tubos se dejaron incubar hasta el día siguiente a 37°C en agitación a 225rpm.

#### Día 2

Al día siguiente se seleccionó el inóculo que presentaba un mayor crecimiento y se traspasó a 250mL de medio LB con ampicilina fresco, y se dejó incubando hasta el día siguiente.

### Día 3

Una vez el cultivo bacteriano llegó a la confluencia, se procedió a la extracción y purificación del plásmido de interés siguiendo el protocolo del kit *PureLink™ Quick Plasmid MaxiPrep* (Invitrogen, K210017) y a la cuantificación mediante el espectrofotómetro NanoDrop3000 (ThermoFisher).

Se ajustó la concentración de los plásmidos obtenidos a 1µg/µL, y se realizaron alícuotas de un solo uso, las cuáles se almacenaron a -80°C y que serían empleadas para la producción de vectores lentivirales.

## **4.- Producción de vectores lentivirales de 3ª generación**

Los vectores lentivirales producidos en esta tesis son de tercera generación. Para la producción de estos se utilizaron tres plásmidos empaquetadores/estructurales, además de un cuarto plásmido que contenía el transgén de interés.

Los tres plásmidos estructurales son:

-pMD2-VSV-G: plásmido que codifica para la proteína de la envuelta VSV-G del virus de la estomatitis.

-pMDLg-pRRE: plásmido que codifica para las poliproteínas gag-pol.

-pRSV-Rev: Plásmido que codifica para la proteína Rev.

El protocolo empleado para la producción de los diferentes vectores lentivirales fue el siguiente:

### Día 1:

Levantar las células HEK293T incubándolas con TrypLE (Gibco, 12604013) durante 5min a 37°C. Una vez levantadas, resuspender las células utilizando 9mL de DMEM y traspasarlas a un tubo de polipropileno de 15mL. Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos. Resuspender en 10mL de DMEM y proceder a su conteo para repartir 10M de células en varias placas de 15cm<sup>2</sup>. Finalmente, añadir 15mL de medio DMEM en cada placa y dejarlas en el incubador hasta el día siguiente.

### Día 2:

Para transfectar las HEK293T con los plásmidos necesarios, se utilizó el reactivo polietilenamina (PEI)(Merck,408727). En dos tubos separados se procedió a hacer las siguientes mezclas (cantidades para transfectar 1 placa):

-Tubo DNA: 675µL de DMEM + 15µg de pRSV-Rev + 15µg de pMDLg-pRRE + 7µg de pMD2-VSV-G + 18µg del plásmido de interés.

-Tubo PEI: 675µL de DMEM + 98,5µL de PEI a 0,13µg/µL.

Se mezcla bien el contenido de ambos tubos utilizando el vórtex y se procede a añadir la mezcla del Tubo PEI sobre la mezcla del Tubo DNA. Una vez mezclados, utilizando el vórtex, se deja incubar 5min a temperatura ambiente.

Durante estos 5min se procede a dejar las pacas de HEK293T con tan sólo 10mL de medio. Seguidamente, se reparte la mezcla de forma homogénea por la placa y se deja incubar 4 horas a 37°C. Una vez pasadas las 4 horas, se procede a retirar el medio y añadir 15mL de medio fresco. Las placas se dejan en el incubador durante 48 horas.

#### Día 4:

Se recoge todo el sobrenadante de las placas en un tubo de polipropileno de 50mL y se vuelven a añadir 15mL de DMEM al cultivo. El sobrenadante se almacena a 4°C hasta el día siguiente.

#### Día 5:

Se vuelve a recoger el sobrenadante de las placas en el mismo tubo de polipropileno de 50mL. La mezcla de sobrenadantes de 48h-72h se clarifica mediante una centrifugación a 900g durante 10min a 4°C y una posterior filtración a través de un filtro de 0,45µm. A este sobrenadante clarificado se añade la solución *LentiX Concentrator* (Condalab, 631232) a una proporción sobrenadante:LentiX 3 a 1. Esta mezcla se deja en agitación a 4°C durante 2 horas.

Una vez transcurridas las 2 horas se centrifuga la mezcla a 1500g durante 45 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante. El pellet que contiene los vectores lentivirales es resuspendido en 100µL de medio y se generan alícuotas de un solo uso que se almacenarán a -80°C.

## 5.-Titulación vectores lentivirales

Para la titulación de los vectores lentivirales se utilizaron las células Jurkat. Primero se cuentan las células y se ajusta su concentración para sembrar 20.000 células en 100  $\mu$ L. Seguidamente, sembraremos ocho pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo plano por cada vector que vayamos a titular.

Una vez sembradas las Jurkat, se realiza un banco de 8 diluciones consecutivas 1:3 a partir del *stock* inicial del vector lentiviral. Estas diluciones se añaden individualmente en el pocillo correspondiente, y se deja incubar durante 48h. Una vez transcurrido el tiempo se procede a realizar un marcaje para evaluar la expresión del transgén por citometría de flujo. El cálculo del título se realiza a partir de las diluciones que obtienen un porcentaje de transducción entre el 40 y 10%, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ Partículas}}{\mu\text{L}} = \frac{20.000 \text{ células Jurkat} * \text{factor de dilución} * \left(\frac{n^{\circ} \text{ células} +}{100}\right)}{\text{volumen de transducción}}$$

Para la transducción de linfocitos T humanos se utiliza una MOI (multiplicidad de infección) de 5 vectores infectivos/célula.

## 6.-Aislamiento de linfocitos T

Con previo consentimiento, los linfocitos T se aislaron de capas leucocitarias de donantes sanos provenientes del Banc de Sang i Teixits (BST).

Para el aislamiento de linfocitos T se utilizó el siguiente protocolo:

A partir de 1mL de la sangre proveniente de la capa leucocitaria, esta se diluyó en una proporción 1 a 5 con tampón fosfato salino (PBS)1X (Gibco, 10010023). A la sangre diluida se le añadieron 300 $\mu$ L del reactivo *RosetteSep Human T cell enrichment cocktail* (StemCell, 15061). Se incubó la sangre diluida con este reactivo durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente se procede a diluir aún más la sangre con PBS1X hasta un volumen final de 30mL. A continuación, se hace una separación por gradiente de densidad mediante una centrifuga a 1200g durante 20 minutos, utilizando 15mL de la solución *LymphoPrep* (StemCell, 7811) sobre la que se depositan los 30mL de sangre diluida.

Tras la separación, se recoge la fase correspondiente a los linfocitos T, y se procede a realizar dos lavados con PBS1X y una centrifugación a 300g durante 10min, para eliminar posibles restos de *LymphoPrep*. Finalmente, los linfocitos T son resuspendidos en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10%FBS, y se

procede a su contaje, bien para su uso en ensayos de expansión de linfocitos T modificados genéticamente, o bien para otro tipo de experimentos.

## **7.-Expansión de linfocitos T modificados genéticamente**

### Día 0:

Una vez aislados, los linfocitos se sembraron a una densidad de  $1M/mL$  en medio RPMI-1640 suplementado con 50UI de IL-2 (Milteny, 130-097-748). Para promover la expansión de los linfocitos, se añadían *Dynabeads CD3/CD28* (Gibco, 11131D) a una proporción 1 *bead* a 1 célula.

### Día 1:

A las 24 horas post-activación, los linfocitos T eran transducidos utilizando el vector lentiviral deseado con una MOI de 5. Para ello, se añadía la cantidad de vector lentiviral necesaria en el pocillo donde se encontraban los linfocitos T y se mezclaba suavemente.

### Día 4:

Se contaban los linfocitos T y se les añadía medio RPMI-1640 suplementado con IL-2 para ajustar la concentración de linfocitos a  $0,8M/mL$ . Además, se procedía a retirar las *Dynabeads CD3/CD28* del cultivo utilizando un imán.

### Día 6-8:

Se contaban los linfocitos y se les añadía medio RPMI-1640 suplementado con IL-2 para ajustar la concentración de linfocitos a  $0,8M/mL$ , cambiando el tamaño del frasco donde se cultivaban si fuese necesario, con tal de promover un intercambio de gases óptimo para el crecimiento de las células..

### Día 9-10:

Se recogía una muestra de los linfocitos T en expansión (entre  $0,1-0,2M$  de linfocitos T), y se procedía a realizar un marcaje para evaluar la eficiencia de transducción por citometría de flujo. Los linfocitos T expandidos eran utilizados posteriormente para los diferentes ensayos funcionales.

## **8.-Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs)**

Con previo consentimiento, los monocitos se aislaron de capas leucocitarias de donantes sanos provenientes del Banc de Sang i Teixits (BST).

### Dia 0:

Para el aislamiento de estas células se utilizaron 10 mL de sangre, que fueron diluidos a un volumen final de 60mL con PBS1X. A partir de esta sangre diluida se procedió a hacer una separación por gradiente de densidad utilizando la solución LymphoPrep, mediante una centrifuga a 1200g durante 20 minutos.

Después de la centrifugación se procedió a recuperar la capa de células polimorfonucleares de la sangre (PBMCs) y se lisaron los eritrocitos mediante el uso del tampón de lisis ACK (Lonza). Estas PBMCs se lavaron 2 veces con exceso de PBS1X y una centrifugación a 2000rpm durante 10 minutos.

Las PBMCs en 10mL de DMEM, y se procedió a su contaje. Las PBMC se sembraron a una densidad de 2 millones de PBMCs/cm<sup>2</sup>, y se dejaron en el incubador durante 2 horas para promover la adherencia de los monocitos.

Una vez transcurridas las 2 horas, se lavó el cultivo con PBS1 X para quitar las células no adheridas. Finalmente, se añadió DMEM suplementado con 10%FBS 300UI/mL de IL-4 (CellGenix, 001403-010) y 450UI/mL de GM-CSF (CellGenix, 001412-010) a los monocitos adheridos.

### Dia 3:

Una vez transcurridas 72h se levantaron los monocitos utilizando PBS 1X frío y se sembraron en los pocillos experimentales en medio DMEM suplementado con IL-4 y GM-CSF.

### Dia 4:

A las 24h se añadió el cóctel de maduración, conformado por IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) (CellGenix, 001411-010), TNF $\alpha$  (10 ng/mL)(CellGenix, 001406-010), IL-6 (10 ng/mL) (CellGenix, 001404-010) y Prostalgandina E<sub>2</sub> (10  $\mu$ g/mL)(Sigma-Aldrich, P0409). Al día siguiente, se utilizaron estas moDC para realizar los experimentos correspondientes.

## 9.-Aislamiento de células NK

Con previo consentimiento, las células NK se aislaron de capas leucocitarias de donantes sanos provenientes del Banc de Sang i Teixits (BST).

Para el aislamiento de estas células se procedió a hacer una separación por gradiente de densidad utilizando la solución LymphoPrep, mediante una centrifuga a 1200g durante 20 minutos. Después de la centrifugación se procedió a recuperar la capa de células polimorfonucleares de la sangre. A partir de estos PBMCs, se procedió al aislamiento de las células NK a través de purificación por columna magnética utilizando el kit *NK isolation* (Miltenyi, 130-092-657). Una vez purificadas las células NK fueron utilizadas en los experimentos pertinentes.

## 10.-Ensayos de citotoxicidad *in vitro* por luminiscencia

Para evaluar la citotoxicidad mediada por los CAR-T ARI-0002h y ARI-0002hU, realizamos un ensayo de citotoxicidad por luminiscencia. Para ello, las líneas celulares diana, ARP-1 y U266, fueron modificadas genéticamente para expresar el transgén GFP-FFLuc, que codifica para la proteína verde fluorescente y la luciferasa de luciérnaga.

En estos ensayos de citotoxicidad, se sembraron 10.000 células diana en pocillos de 96 en una placa opaca, para evitar señal cruzada de luminiscencia entre pocillos. Se evaluó la citotoxicidad a diferentes proporciones de células efectoras:células diana, (2:1, 1:1 y 0,5:1), sembrando en cada caso el número de linfocitos CAR-T correspondiente en cada condición. Se evaluaba la luminiscencia a las 24horas posteriores al inicio del co-cultivo. Para ello, se añadía en cada pocillo 3 $\mu$ L de Luciferina a una concentración de 20mg/mL(Perkin-Elmer, 122799), y pasados 10 minutos se hacía la lectura de la luminiscencia a longitud de onda 537nm en el lector de placas Synergy HT.

Para evaluar el efecto citotóxico de los linfocitos CAR-T, se evaluaba la disminución de la luminiscencia respecto a la luminiscencia promedio de los controles negativos.

## **11.-Ensayos de citotoxicidad por impedancia**

Para el estudio de la citotoxicidad mediada por los linfocitos CAR-T dirigidos contra la proteína S del SARS-CoV-2, realizamos ensayos de citotoxicidad por impedancia. Para ello utilizamos el Xcelligence, un equipo que permite medir en pocillos especiales el paso de la corriente eléctrica. El principio que sigue para evaluar la citotoxicidad se basa en que las células adheridas impiden el paso de corriente eléctrica. Cuando estas células son lisadas por el efecto de los linfocitos CAR-T, se desadhieren del fondo del pocillo y se incrementa el paso total de corriente eléctrica. Estos cambios se expresan en una unidad arbitraria de “índice celular”.

En estos ensayos de citotoxicidad, se sembraron 10.000 células diana y se dejaron adherir al fondo del pocillo durante la noche. Haciendo medidas de índice celular cada 20 minutos. Al día siguiente, se añadían los linfocitos CAR-T en una proporción célula efectora: célula diana de 5:1, y se hacían medidas del índice celular cada 20 minutos durante 48-72h.

Al final del experimento se evaluaba la capacidad citotóxica de los linfocitos CAR-T comparando el índice celular frente al índice celular de la condición control con linfocitos T no modificados (UT).

## **12.-Cuantificación de citocinas y proteínas solubles**

Para la cuantificación de la secreción de proteínas solubles se realizaron ensayos de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Se cuantificaron diferentes citocinas (IFN $\gamma$ , IL-2, Granzima B y TNF- $\alpha$ ) utilizando los kits de DuoSet ELISA (R&D systems) específicos para cada una, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

La cuantificación se realizó a partir de los sobrenadantes obtenidos de los diferentes ensayos de citotoxicidad. Para la cuantificación de IFN $\gamma$  e IL-2, los sobrenadantes se diluyeron 1/10, para el TNF $\alpha$  se diluyeron 1/4, y para la Granzima B 1/50, en PBS 1X. La lectura de los resultados por colorimetría se realizó en el espectrofotómetro de placas Synergy HT.

### 13.-Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría de flujo se realizaron los marcajes de la siguiente manera. En la mayoría de los casos recogía una muestra de entre 100.000-200.000 células para el marcaje o bien una muestra de 100µL de cultivo. En los marcajes en que se utilizaban anticuerpos directamente conjugados con un fluorocromo se procedía con el siguiente protocolo:

Las células se lavaban en PBS 1X, y se centrifugaban a 1500rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se decantaba el sobrenadante y se añadían 100µL de una solución que contenía los anticuerpos deseados. Se procedía a incubar 20 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz para evitar el fotoblanqueamiento de los fluorocromos. Se procedía a hacer un segundo lavado con PBS 1x y una posterior centrifugación. Finalmente, se descartaba el sobrenadante y se añadía 150µL de PBS 1X en los tubos de ensayo si las muestras se iban a adquirir al momento, o bien, 150µL de una solución de paraformaldeído (PFA) al 2% para fijar las células, si se iban a adquirir al día siguiente.

En aquellos marcajes en que se utilizaban un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo el protocolo de marcaje fue el siguiente:

Las células se lavaban en PBS 1X, y se centrifugaban a 1500rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se decantaba el sobrenadante y se añadían 100µL de una solución que contenía los anticuerpos deseados. Se procedía a incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a hacer un segundo lavado, y se añadió en el tubo de ensayo 100µL de la solución con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo, y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos en ausencia de luz para evitar el fotoblanqueamiento de los fluorocromos. Finalmente, se procedió a hacer un último lavado con PBS, y las muestras se resuspendieron en 150µL de PBS o de PFA 2%

Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo Attune NxT.

Para la evaluación de los diferentes marcadores se utilizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos:

·Evaluación de la expresión del CAR:

Anti CD4-PerCP (BioLegend, 317432)

Anti CD8-Alexa Fluor 700 (BD Biosciences, 557945)

Biotin Goat Anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> (Jackson immunoResearch, 109-065-006)

Streptavidin-PE (ThermoFisher, 12-4317-87)

·Evaluación de la expresión de CD3 y HLA-A,B,C:

Anti CD3-BV510 (BD Biosciences, 564713)

Anti HLA-A,B,C-PE (BioLegend, 311406)

·Evaluación de la expresión de CD7 y HLA-A,B,C:

Anti CD7-BV510 (BD Biosciences, 563650)

Anti HLA-A,B,C-PE (BioLegend, 311406)

·Evaluación de la expresión de CD3, HLA y CAR:

Biotin Goat Anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> (Jackson immunoResearch, 109-065-006)

Streptavidin-BV421 (BD Biosciences, 563259)

Anti HLA-A,B,C-PE (BioLegend, 311406)

Anti CD3-APC (BioLegend, 317318)

·Evaluación de la expresión de CD3, HLA y TCRαβ:

Anti HLA-A,B,C-PE (BioLegend, 311406)

Anti CD3-BV510 (BD Biosciences, 564713)

Anti TCRαβ-APC (ThermoFisher, 17-9986-42)

·Evaluación de la expresión de marcadores de agotamiento:

Biotin Goat Anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> (Jackson inmunoResearch, 109-065-006)

Streptavidin-BV421 (BD Biosciences, 563259)

Anti PD-1-APC (BD Biosciences, 558694)

Anti LAG-3- PE-Cy7 (Invitrogen, 25-2239-42)

Anti CTLA-4-PE (BD Biosciences, 557301)

Anti CD8 APC-H7 (BD Biosciences, 566855)

·Evaluación de la expresión de marcadores de memoria:

Biotin Goat Anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> (Jackson inmunoResearch, 109-065-006)

Streptavidin-BV421 (BD Biosciences, 563259)

Anti CCR7 -PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, 561144)

Anti CD45RA-PE-Cy7 (BD Biosciences, 560675)

Anti CD8-APC-H7 (BD Biosciences, 566855)

·Evaluación de la degranulación:

Anti CD107a-BV421 (BD Biosciences, 562623)

Cell Trace Far Red (ThermoFisher, C34564)

·Evaluación de la pureza de células NK:

Anti CD56-PE (BioLegend, 304606)

·Evaluación de la alogenicidad:

Anti CD154-BV421 (BD Bioscience, 563886)

Anti CD69-PE (BD Biosciences, 341652)

Cell Trace Far Red (ThermoFisher, C34564)

#### **14.-Purificación de linfocitos T CD3<sup>low/-</sup>**

Para la purificación de linfocitos CD3<sup>low/-</sup> para su uso en ensayos *in vitro* se utilizó el kit de *CD3 magnetic beads* (Miltenyi, 130-050-101), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Para la purificación de linfocitos CD3<sup>low/-</sup> para su uso en ensayos *in vivo* se utilizó el separador de células MACSQUANT Tyto (Miltenyi).

#### **15.-Ensayos de citotoxicidad consecutiva**

Para evaluar la persistencia en la citotoxicidad de los linfocitos CAR-T dirigidos contra la proteína S del SARS-CoV-2 se realizaron ensayos de citotoxicidad consecutiva. Para su realización se procedió de la siguiente manera:

El ensayo se realizó en una placa de 48 pocillos. Se sembraron las células diana y los linfocitos CAR-T en una proporción 5:1. A las 48 horas añadimos en el mismo pocillo el doble de la cantidad de células diana iniciales. Así sucesivamente hasta llegar a un cuarto reto. Además, este cuarto reto se realizó en el Xcelligence para evaluar diferencias en la citotoxicidad de los diferentes linfocitos CAR-T.

Durante el curso del experimento, al final de cada reto, se cogieron 100uL del medio de cultivo para marcar con CD3 o CD45, para evaluar la evolución del número de linfocitos T.

Una vez acabado el último reto se evaluó por citometría de flujo la expresión de marcadores asociados al agotamiento de los linfocitos T.

#### **16.-Ensayos de aloreactividad**

Para evaluar la aloreactividad de los linfocitos T CD3US6 *in vitro* se realizó un ensayo de *mixed lymphocyte reaction* utilizando moDCs alogénicas provenientes de donantes sanos. Para ello, se co-cultivaron los linfocitos UT o CD3US6 con células moDC (10 linfocitos T: 1 moDC) bien durante 6 horas para evaluar por citometría de flujo la degranulación a través de la expresión del marcador CD107a, o bien durante 5 días para evaluar la producción de IFN $\gamma$  a través de un ELISA.

### **17.-Ensayos de alogenicidad**

Para evaluar la alogenicidad de los linfocitos T CD3US6 *in vitro* se realizó un ensayo de *mixed lymphocyte reaction*, utilizando linfocitos T alogénicos provenientes de donantes sanos. Para este ensayo, se co-cultivaron los linfocitos alogénicos, previamente teñidos con el reactivo *Cell Trace Far Red* (CTFR), junto a linfocitos UT o CD3US6 en una proporción 1 a 1. A las 16 horas de co-cultivo, se evaluó la expresión de marcadores de activación como CD69 y CD154 en los linfocitos T alogénicos por citometría de flujo.

### **18.-Ensayos de degranulación**

Para los ensayos de degranulación de las células NK frente a linfocitos T CD3US6, se teñieron las células NK con CTFR. Después, estas células se co-cultivaron con los linfocitos UT o CD3US6 en una proporción 1 a 1 durante 6 horas. Pasadas las 6 horas se procedió a marcar CD107a para evaluar la activación de las células NK a través de citometría de flujo.

### **19.-Ensayos *in vivo***

Los estudios *in vivo* con ratones fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Barcelona.

El establecimiento y el mantenimiento de la colonia de ratones fue llevado a cabo por la Dra. María Val. Para los experimentos se utilizaron ratones de la cepa NSG, NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ, (The Jackson laboratory). Estos ratones modificados genéticamente, presentan una serie de mutaciones que inducen una inmunodeficiencia severa combinada (deficiencia en la expresión del receptor de la IL-2, inhabilitando la señalización de citocinas y provocando una falta de linfocitos T, B y NK funcionales). Estas mutaciones hacen que esta cepa sea permisiva para el estudio del sistema inmune humano en diferentes escenarios patológicos.

En todos los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones de entre 8-12 semanas de edad.

En el primer ensayo *in vivo* se inyectaron los ratones con 10M de linfocitos T UT o CD3US6 por la vena lateral de la cola. Además, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal semanal de 50.000UI de IL-2 humana mientras duró el experimento, para favorecer la supervivencia y el injerto de estos linfocitos humanos en el ratón. Durante el experimento los ratones recibieron un régimen de comida y agua *ad libitum*.

Para evaluar la aparición de la enfermedad xenoinjerto contra receptor (XvHD) se siguió una serie de guías establecidas previamente en la literatura. Para ello, dos veces por semana se evaluaba el peso de los ratones, la movilidad, la expresión facial, la postura,

el estado del pelo y de la piel. Además, se extrajo sangre de los capilares de la mejilla una vez por semana para evaluar la presencia de linfocitos T humanos en sangre. Cuando la sintomatología de los ratones se correspondía con un cuadro clínico de XvHD severo, se eutanasiaron mediante sobredosis anestésica y dislocación cervical y se procedió a la disección de varios tejidos para su posterior análisis.

En el segundo ensayo *in vivo* los ratones recibieron una irradiación de cuerpo completo de 2Gy y fueron inyectados con  $1 \times 10^6$  células ARP-1. A día 6 de experimento se administraron los diferentes linfocitos T o CAR-T humanos por vía intravenosa. Cuando la enfermedad en los ratones alcanzaba una severidad moderada, estos se eutanasiaron mediante sobredosis anestésica y dislocación cervical.

El seguimiento del crecimiento tumoral *in vivo* fue evaluado dos veces por semana mediante una inyección intraperitoneal de 100 $\mu$ L de Luciferina 20mg/mL, y la posterior evaluación de la luminiscencia emitida por las células ARP-1 a través del equipo IVIS.

## **20.-Ensayos de citotoxicidad con infección de SARS-CoV-2**

Para evaluar la actividad citotóxica contra células epiteliales pulmonares infectadas, se utilizaron células Calu-3. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad por impedancia utilizando el XCelligence. Se realizó una medición basal mediante la adición de 80  $\mu$ L de DMEM suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, se sembraron células Calu-3 a una densidad de  $1,7 \times 10^4$  células por pocillo y se cultivaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en 80  $\mu$ L de DMEM suplementado con 10% de FBS para permitir su adhesión y crecimiento. Después del período de adhesión, las células Calu-3 fueron infectadas con SARS-CoV-2 (MOI  $10^{-4}$ ) en DMEM sin FBS durante dos horas. Luego, el medio se reemplazó por RPMI-1640 fresco suplementado con 10% de FBS. Siete horas más tarde, se añadieron células T no modificadas o células CAR-T específicas para SARS-CoV-2 en una proporción 5:1 (célula efectora:célula diana).

## **21.- Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software GraphPad PRISM v8.1. En aquellos grupos de datos en que se comparaban las medias de dos grupos independientes se utilizó la prueba estadística T-student, en el caso que hubiesen más de dos grupos se realizó la prueba estadística One-way ANOVA.

# Resultados



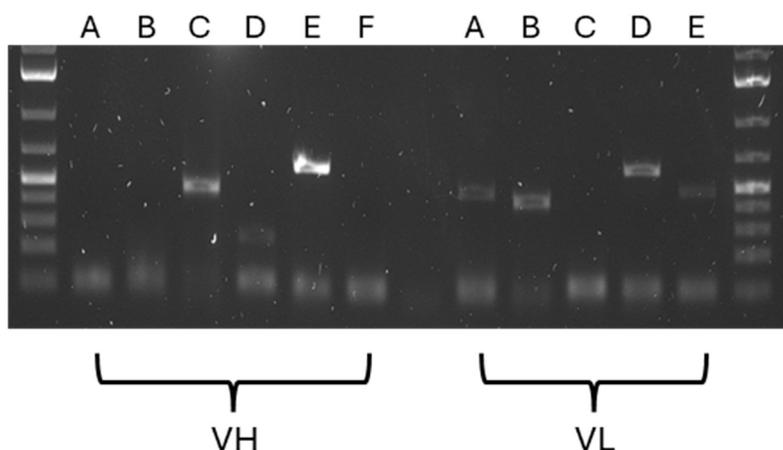
## 1.- Desarrollo de un nuevo motivo de retención que permita la disminución en superficie de CD3 y moléculas de HLA-I

### 1.1-Secuenciación del hibridoma 33-2A3 dirigido contra CD3 $\epsilon$

Para poder obtener la secuencia de un anticuerpo murino dirigido contra CD3 $\epsilon$ , se procedió a crecer el hibridoma 33-2A3 que había sido generado previamente en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona a partir de la inmunización de ratones inmunocompetentes con epítomos humanos. Una vez crecidas estas células de hibridoma, procedimos a extraer su RNA utilizando un kit comercial. A partir del RNA total extraído, se generó el cDNA utilizando un kit de retrotranscripción *in vitro*.

Obtenido el cDNA del hibridoma, se realizaron reacciones de PCR basadas en diferentes combinaciones de cebadores. Estos cebadores permiten la amplificación de las secuencias que codifican para los fragmentos variables de cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas. Para determinar que combinación de cebadores permitía la amplificación, se corrió un gel de electroforesis (**Figura 14A**).

Determinada las combinaciones de cebadores, se enviaron a secuenciar los productos de PCR obtenidos a una empresa externa. Las secuencias obtenidas (**Figura 14B**) se validaron usando diferentes herramientas bioinformáticas. Finalmente, se procedió a generar una secuencia de scFv combinando las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera con un *linker* peptídico basado en cuatro repeticiones de la secuencia Gly-Gly-Gly-Ser.



VH	CAGATCGTGCTTACCCAAAGTCCTGCCATTATGAGTGCTTCACCGGGAGAAAAAGTTACAAT GACATGTTCTGCCAGCTCCTCCGTCCTCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCTGGCACTT CACCCAAGCGCTGGATATACGATAGTTCTAAGCTCGCATCCGGCGTACCCGCACGTTTTAG TGGTAGCGGTAGCGGGACTTCATACTCTCTGACGATCAGCAGCATGGAAGCCGAGGACGC GGCTACTTACTACTGCCAGCAGTGGTCAAGAAATCCTCCCACATTCGGAGGTGGGACCAAG CTGGAGATTAAGG
	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFRSTMHWVKQRPQGQLEWIGYINP SSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPQVHYDYNF PYWGQGTITVTVSS
VL	CAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGGGCCGAATTGGCCAAGCCGGGAGCATCGGTCAAGAT GTCATGCAAAGCCAGCGGATATACTTTCACCCGGTCTACAATGCATTGGGTGAAACAGCGA CCCGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTGGCTATATCAATCCTAGCAGCGCCTATACAACTACA ACCAGAAATCAAGGACAAAGCTACTCTGACCGCTGATAAGAGCTCCAGTACGGCGTATATG CAGTTATCCTCACTCACAAAGCGAGGACAGTGCAGTGTATTACTGTGCTAGACCACAGGTTCA CTATGATTATAATGGGTTCCATACTGGGGCAAGGAACCACCGTGACCGTCTCGTCA
	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLA GVPARFSGSGSGLYSISLTISSMEAEDAATYYCQQWSRNPPTFGGGTKLEIKR

**Figura 14** Secuenciación de las regiones variables del anticuerpo 33-2A3 contra CD3ε. **A.** Amplificación de las secuencias de DNA de la región variable pesada (VH) y la región variable ligera (VL). **B.** Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las cadenas VH y VL.

## 1.2-Efecto de la expresión de inmunoevasinas virales en linfocitos T humanos

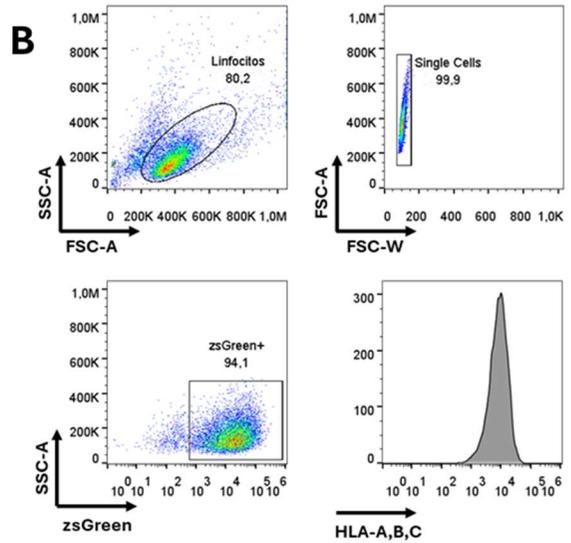
En base en lo establecido en la literatura, decidimos seleccionar tres inmunoevasinas virales (E19K (UniProt: P04494), US3 (UniProt: F5HEU0) y US6 (UniProt: P14334)) para probar su efecto sobre la expresión de HLA-I en linfocitos T humanos. Para ello, se clonó la secuencia codificante de estas tres proteínas, seguidas de un dominio autoescindible T2A y la secuencia codificante de la proteína zsGreen en un plásmido de expresión pCCL-EF1α (**Figura 15A**). La expresión de estos transgenes se da bajo el promotor EF1α, que se expresa de forma constitutiva en la mayor parte de las células humanas. Este plásmido permite además la formación de vectores lentivirales de 3ª generación.

Una vez obtenidos los vectores lentivirales, se transdujeron linfocitos T humanos para evaluar el efecto de estas inmunoevasinas a través de citometría de flujo (**Figura 15B**). Los resultados indican que tan solo la expresión de la inmunoevasina US6 es capaz de mediar una reducción significativa en la cantidad de moléculas de HLA-I en la superficie de los linfocitos T humanos, expresado como una reducción en la intensidad promedio de la fluorescencia (MFI)(**Figura 15C y D**).

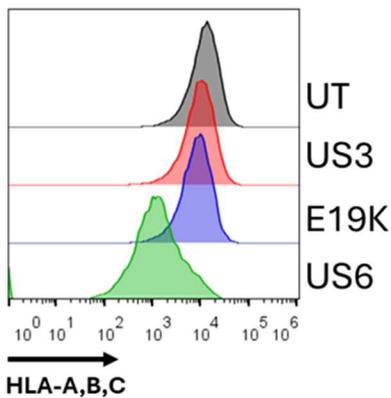
**A**



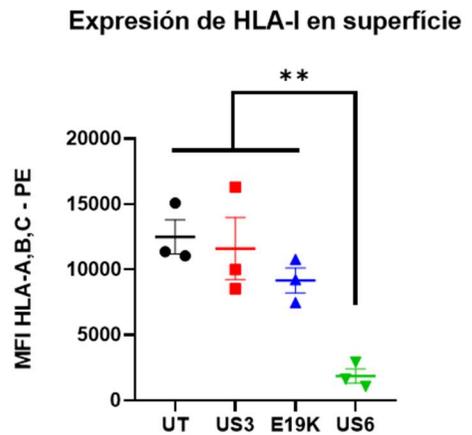
**B**



**C**



**D**



**Figura 15 Expresión de diferentes inmunoevasinas en linfocitos T humanos.** **A.** Esquema de los transgenes diseñados con las diferentes inmunoevasinas. **B.** Estrategia de gating en citometría de flujo para evaluar la expresión de HLA-I. **C.** Histograma comparativo de la expresión de HLA-I en las diferentes condiciones experimentales. **D.** Análisis conjunto de los valores de la intensidad promedio de fluorescencia (MFI) para HLA-I (n=3 donantes independientes). \*\*p<0.0021

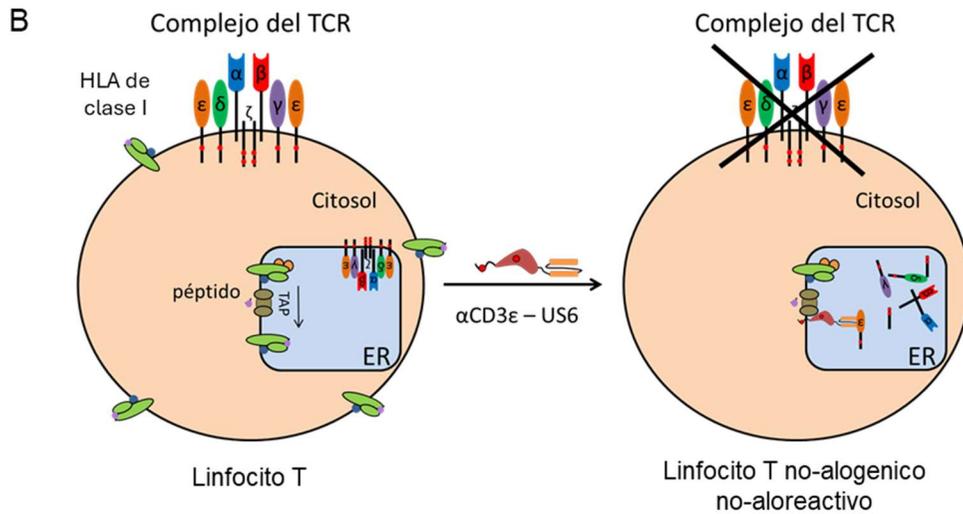
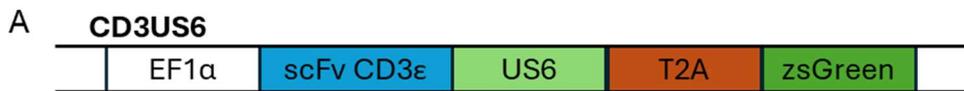
### 1.3-Efecto de la proteína quimérica CD3US6 en linfocitos T humanos

Una vez determinado que la inmunoevasina US6 podía mediar un efecto sobre la expresión de HLA-I, procedimos a diseñar un transgén que permitiese la formación de un intracuerpo contra CD3 $\epsilon$ . Para ello, se fusionó la secuencia codificante del scFv contra CD3 $\epsilon$  (descrita en 1.1- Secuenciación del hibridoma 33-2A3 dirigido contra CD3 $\epsilon$ ) al extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína US6, generando la proteína quimérica CD3US6. De esta manera, la región correspondiente al scFv quedaría dentro del lumen del retículo endoplasmático, donde podría interactuar con CD3 $\epsilon$  y retenerlo. A continuación, se añadió un elemento T2A seguido de la secuencia codificante de la proteína fluorescente zsGreen. Este transgén fue clonado en el plásmido pCCL-EF1 $\alpha$  (**Figura 16A y B**).

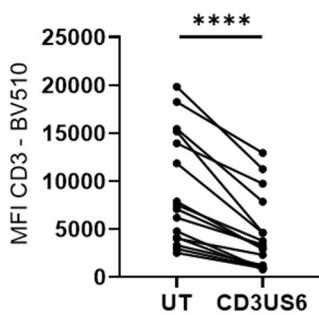
Una vez obtenidos los vectores lentivirales, se transdujeron linfocitos T humanos provenientes de donantes sanos, y se evaluó la expresión tanto de CD3 como de HLA-I a través de citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran una reducción significativa en el valor de la MFI de CD3 y HLA-I en los linfocitos que expresan la proteína CD3US6, siendo por tanto capaz de mediar la retención de ambas moléculas de forma simultánea (**Figura 16C y D**).

También se monitorizó la expresión tanto de CD3 como de HLA-I a lo largo de 30 días para ver si la retención era estable. La evaluación de la retención de estas moléculas a lo largo del tiempo muestra fluctuaciones, pero el porcentaje de expresión se mantiene alrededor del 50% en los linfocitos modificados respecto a los linfocitos UT (**Figura 16E y F**).

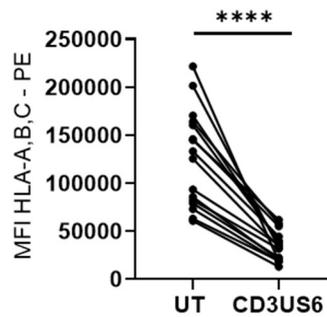
Finalmente, procedimos a evaluar si la retención de CD3 $\epsilon$  interfería con la expresión del TCR en superficie. A través de citometría de flujo se determinó que hay una reducción en la expresión de las moléculas de TCR en la superficie de los linfocitos T modificados (**Figura 16G**).



**C** **Expresión de CD3 en superficie**

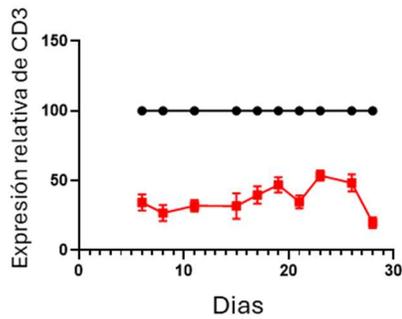


**D** **Expresión de HLA-I en superficie**



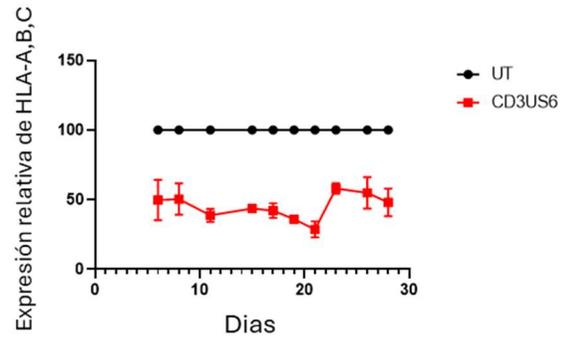
G

Retención de CD3 a largo plazo (n=5)

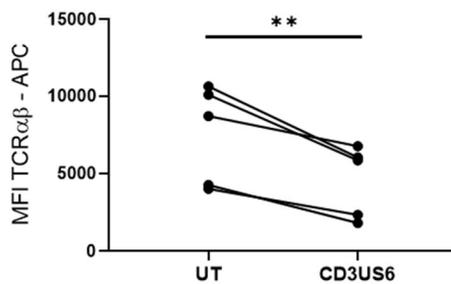


H

Retención de HLA-I a largo plazo (n=5)



G

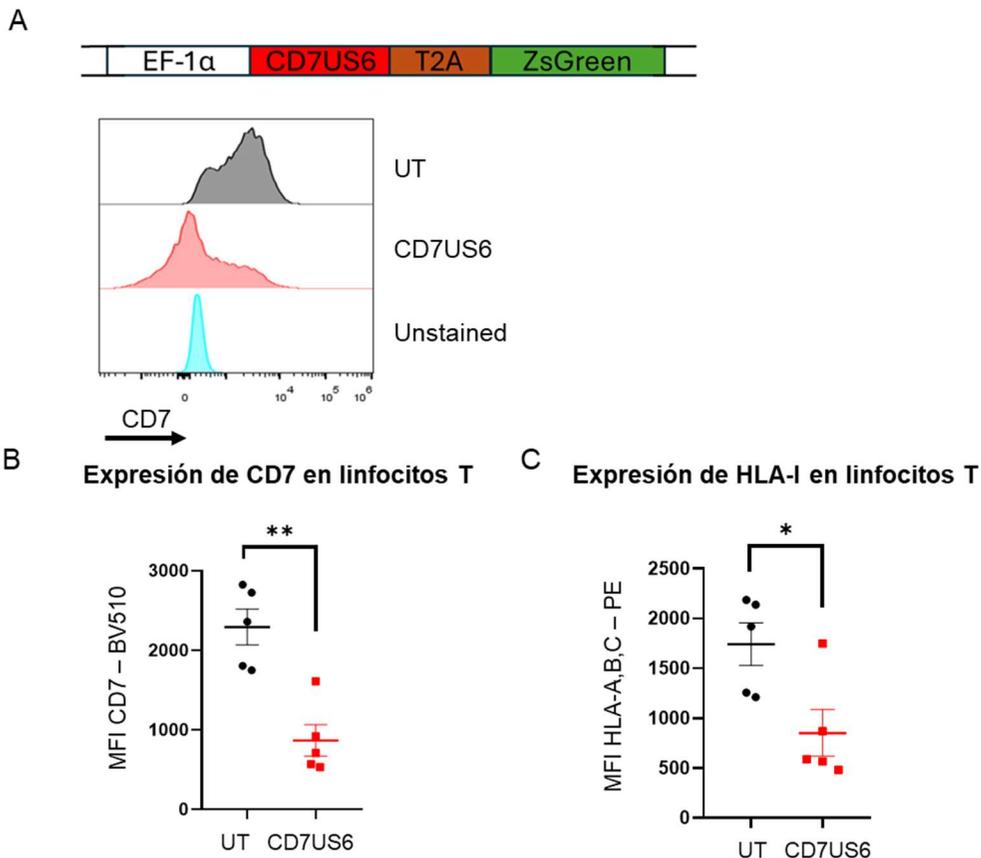
Expresión de TCR $\alpha\beta$  en linfocitos T

**Figura 16 Estudio de la proteína quimérica CD3US6.** **A.** Diagrama que muestra los diferentes elementos contenidos en el transgén que codifica para la proteína CD3US6. **B.** Diagrama que muestra el mecanismo de acción teórica de la proteína CD3US6. **C y D.** Gráficos que muestran el análisis conjunto de la expresión de CD3 y HLA-I en linfocitos T UT o CD3US6 a día 9 de expansión (n=16 donantes independientes). **E y F.** Gráficos que muestran la expresión relativa de CD3 y HLA-I en linfocitos T UT y CD3US6 durante un período de 28 días (n=5 donantes independientes). **G.** Gráfico que muestra la expresión de TCR $\alpha\beta$  en linfocitos T UT o CD3US6 a día 9 de expansión (n=5 donantes independientes). \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 1.4-Retención de CD7 a través del intracuerpo CD7US6

Una vez establecido que la proteína US6 puede ser utilizada como un motivo de retención intracelular, se procedió a estudiar si esta estrategia podía aplicarse para otras moléculas de interés como CD7.

Para ello, se generó un nuevo transgén cambiando la secuencia codificante para el scFv contra CD3 $\epsilon$  por una secuencia que codificaba para un scFv dirigido contra CD7 (**Figura 17A**). Una vez generados los vectores lentivirales, se transdujeron linfocitos humanos para evaluar el efecto de la proteína quimérica CD7US6 sobre la expresión de CD7 y HLA-I. Los resultados obtenidos muestran una reducción significativa en la expresión de ambas moléculas (**Figura 17B y C**).



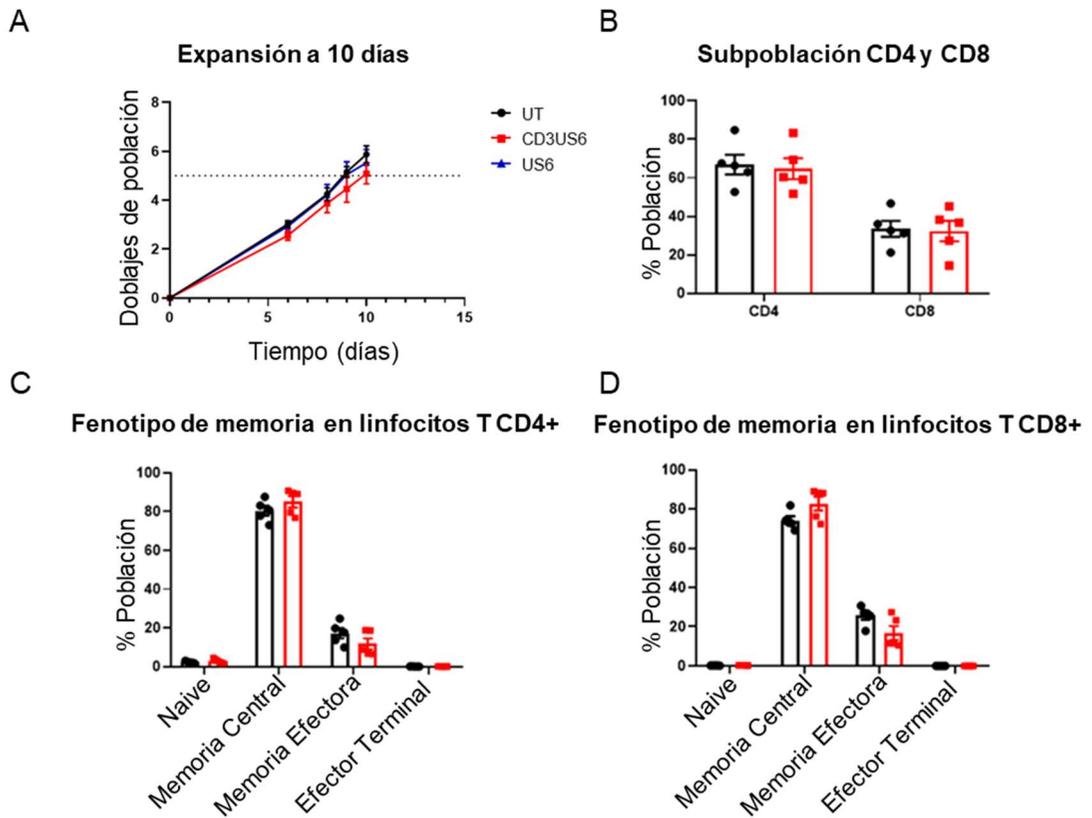
**Figura 17 Retención de la proteína CD7** **A.** Diagrama esquemático del transgén expresado y gráficos de citometría de flujo donde se visualiza la expresión de CD7 en las diferentes condiciones. **B y C.** Análisis agrupado ( $n=5$  donantes independientes) de la intensidad promedio de fluorescencia para la expresión de HLA de clase I y CD7 en linfocitos T UT y CD7US6.  $**p<0.0021$ ,  $*p<0.0332$ .

### 1.5-Efecto de la expresión de CD3US6 sobre el fenotipo de los linfocitos T

Finalmente, procedimos a evaluar si la expresión de CD3US6 podía tener algún efecto negativo sobre el crecimiento de los linfocitos T, así como evaluar posibles efectos sobre la proporción CD4/CD8 o sobre la generación de células efectoras o de memoria.

Para evaluar el efecto sobre el crecimiento se realizó un ensayo de expansión a 10 días. En este, se activaron los linfocitos T con *dynabeads CD3/CD28*. El crecimiento de los linfocitos T se refleja en doblajes de población. Al final del ensayo, los resultados muestran que los linfocitos CD3US6 muestran un crecimiento muy similar a los linfocitos UT o a aquellos transducidos para expresar tan solo la proteína US6 (**Figura 18 A**).

La determinación de la proporción CD4/CD8 y del fenotipo de memoria o efector de los linfocitos T se realizó al final del protocolo de expansión. Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD8, así como de las moléculas CD45RA y CCR7, asociadas a un fenotipo de memoria de los linfocitos T. Los resultados obtenidos muestran que no hay un cambio significativo en los porcentajes de las subpoblaciones CD4/CD8, así como tampoco hay un cambio en el patrón de expresión de CD45RA y CCR7 en los linfocitos T CD3US6 en comparación a los linfocitos UT (**Figura 18 B,C y D**). De esta, manera determinamos que la expresión de CD3US6 no tiene ningún efecto sobre el crecimiento o la diferenciación de los linfocitos T humanos según los marcadores evaluados.



**Figura 18 Efecto de la expresión de CD3US6 sobre el fenotipo de los linfocitos T A.** Gráfico que muestra el crecimiento de los linfocitos T en un protocolo de expansión a 10 días ( $n=3$  donantes independientes). **B.** Gráfico que muestran la proporción CD4 /CD8 en los linfocitos UT y CD3US6 ( $n=5$  donantes independientes). **C y D.** Gráficos que muestran los porcentajes de los diferentes subtipos de linfocitos T de memoria dentro de las poblaciones CD4 y CD8 ( $n=5$  donantes independientes).

## **1.6.- Evaluación de la eficacia de CD3US6 para disminuir la respuesta alogénica**

Una vez establecido que la expresión de CD3US6 permitía generar una disminución significativa de las proteínas deseadas en la superficie del linfocito T, vimos que no conseguíamos lograr una retención completa de estas. Por ello, procedimos a investigar si funcionalmente esta disminución era suficiente para evitar o al menos lograr un menor grado de rechazo y GvHD. Para ello hicimos diferentes ensayos para evaluar la respuesta de estos linfocitos CD3US6 en un contexto alogénico.

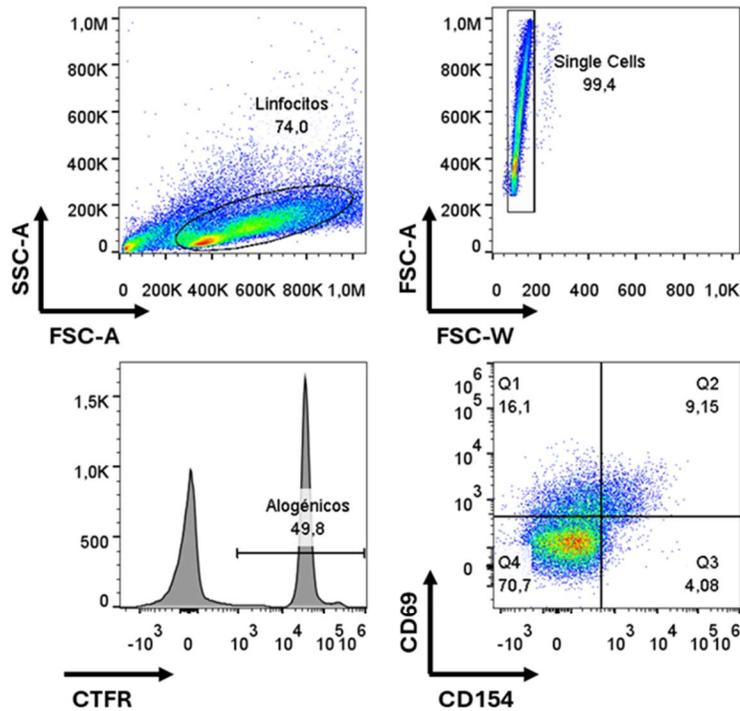
### **1.6.1.-Evaluación de la reducción de HLA-I sobre el rechazo inmunológico**

El rechazo inmunológico es un fenómeno en el cual el sistema inmune del receptor reconoce las moléculas de HLA del injerto como extrañas, generándose una reacción contra este. En este contexto de rechazo, los linfocitos T juegan un papel crucial, mediando la destrucción del injerto.

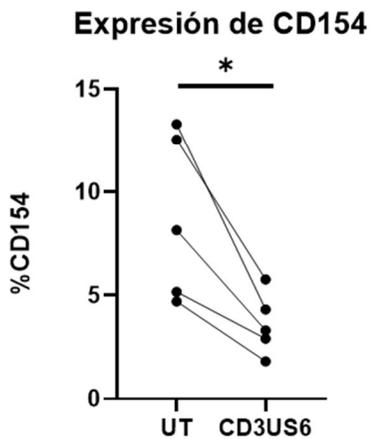
En nuestro caso, para proceder a evaluar el rechazo en un contexto alogénico, se cultivaron linfocitos UT o CD3US6 junto a linfocitos T provenientes de diferentes donantes alogénicos, a una proporción 1:1. Para poder diferenciar entre los linfocitos de los dos donantes, se tiñeron con el colorante CFSE los linfocitos procedentes de los donantes alogénicos.

Para evaluar la reactividad de estos linfocitos en un contexto alogénico, 16h después del inicio del co-cultivo se estudió por citometría de flujo la expresión de marcadores de activación, como CD69 y CD154 (**Figura 19A**). Los resultados obtenidos muestran cómo una disminución en la expresión de HLA-I en superficie es suficiente para atenuar la respuesta de rechazo mediada por los linfocitos T en un contexto alogénico, en tanto que la presencia de marcadores de activación en los linfocitos provenientes de un donante alogénico es menor cuando estos son cultivados junto a linfocitos CD3US6 que linfocitos UT (**Figura 19 B y C**).

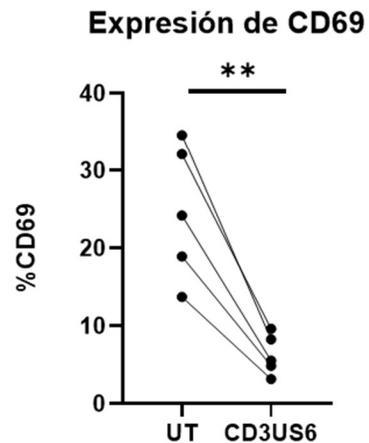
A



B



C

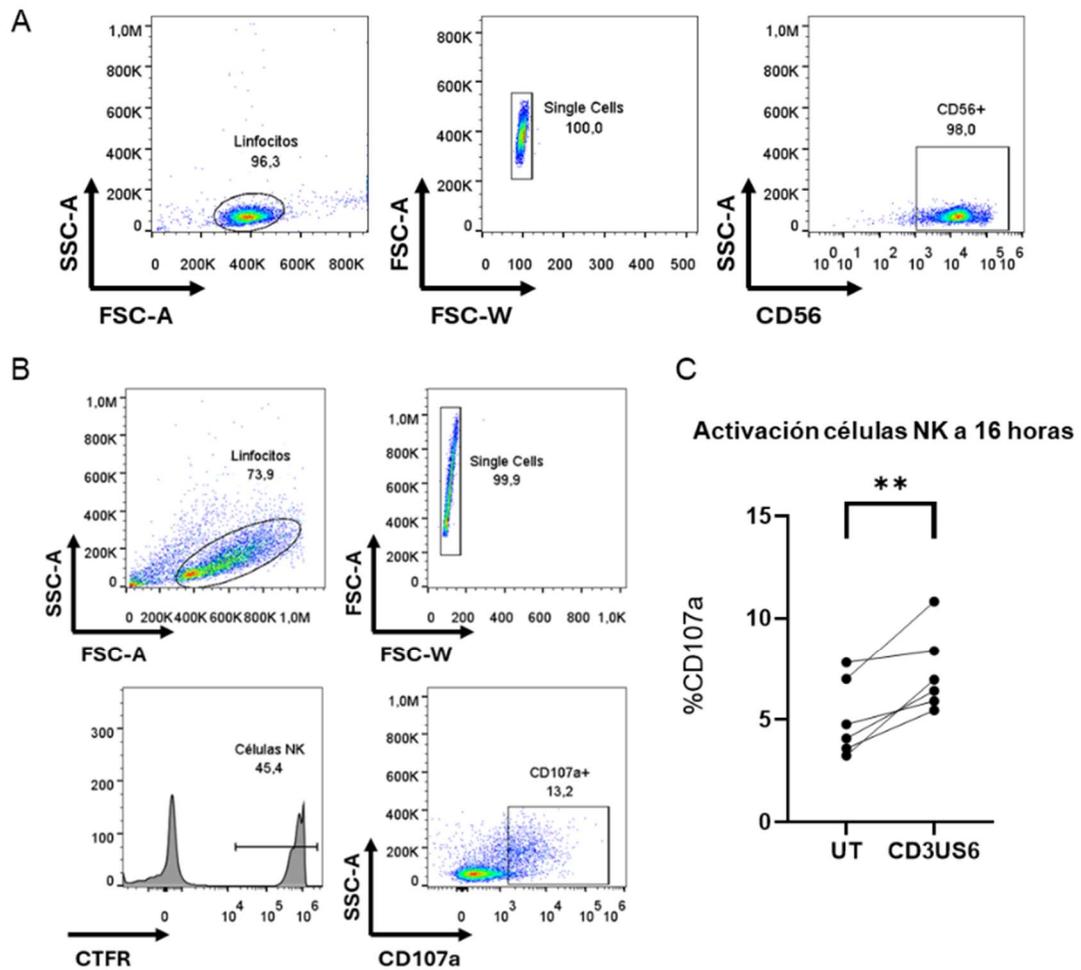


**Figura 19 Efecto de la reducción de HLA-I sobre el rechazo inmunológico A.** Estrategia de gating para detectar la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD154 en los linfocitos T provenientes de donante alogénico (CTFR+). **B y C.** Gráficos que muestran los porcentajes de linfocitos T alogénicos CD69+ o CD154+ cuando son cultivados junto a linfocitos UT o CD3US6 (n=5 donantes independientes) \*\* $p < 0.0021$ , \* $p < 0.0332$ .

### **1.6.2.-Reconocimiento por parte de las células NK hacia los linfocitos CD3US6**

Dentro del sistema inmunológico encontramos las células NK. Estas células pertenecen al sistema inmune innato y se encargan de mediar la lisis de células que han perdido la expresión de las moléculas de HLA-I. Por este motivo, procedimos a estudiar si en un contexto alogénico, estas células NK podían reconocer a los linfocitos CD3US6 y eliminarlos. Para ello, aislamos células NK de sangre periférica (**Figura 20A**), e hicimos un co-cultivo de estas con linfocitos UT o CD3US6 a una proporción 1:1. Para evaluar si las células NK se activaban frente a los linfocitos CD3US6, hicimos un ensayo de degranulación por citometría de flujo, marcando CD107a 6 horas después del inicio del co-cultivo (**Figura 20B**).

Los resultados obtenidos muestran que los linfocitos CD3US6, al tener una menor expresión de HLA-I en su superficie, generan una mayor activación de las células NK, en tanto que se ve un aumento significativo en la degranulación de estas (**Figura 20C**). De esta manera, los resultados sugieren que los linfocitos CD3US6 serían más susceptibles a ser eliminados por las células NK en un contexto de trasplante alogénico.



**Figura 20 Reconocimiento por parte de las células NK hacia los linfocitos CD3US6** **A.** Análisis por citometría de flujo para determinar la pureza de las células NK aisladas de sangre periférica a través del marcador CD56. **B.** Estrategia de gating para determinar el porcentaje de células NK CD107+. **C.** Análisis conjunto ( $n=6$ ) de la activación de las células NK frente a linfocitos T UT y CD3US6, en base al porcentaje de células CD107a+.  $**p<0.0021$ .

### 1.6.3.-Determinación del efecto de CD3US6 sobre el GvHD *in vitro*

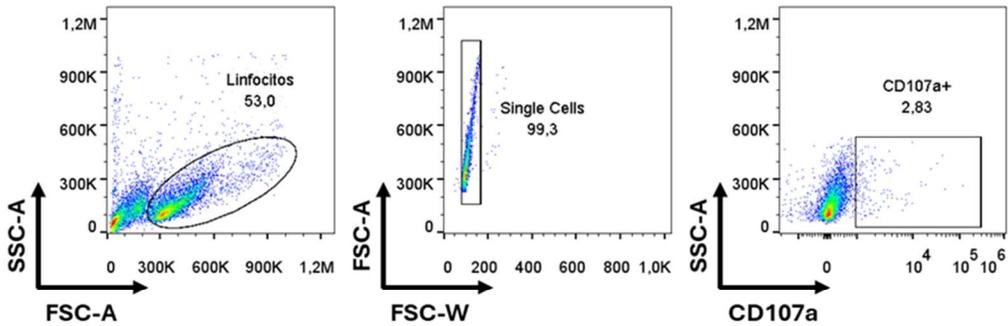
El GvHD un fenómeno inmunológico que ocurre porque los linfocitos T provenientes de un donante alogénico reconocen las moléculas del HLA del receptor como extrañas, generándose una reacción contra los tejidos de este.

Para determinar si los linfocitos CD3US6 presentan una respuesta menor frente a un estímulo alogénico realizamos co-cultivos de linfocitos T con un *pool* de moDCs provenientes de diferentes donantes alogénicos. La evaluación de la respuesta de los linfocitos T frente a este estímulo alogénico se hizo mediante la detección del marcador de degranulación CD107a (**Figura 21A**), el cual nos indicará si está habiendo actividad citotóxica frente a las moDCs alogénicas. Además, se procedió a cuantificar por vía de un ELISA la presencia de la citocina IFN $\gamma$ , la cuál es producida por los linfocitos T activados, en el sobrenadante del co-cultivo.

El análisis de los datos correspondientes a estos experimentos muestra como los linfocitos CD3US6 tienen una menor degranulación, en comparación a linfocitos control, frente a las moDCs alogénicas 6h después del inicio del co-cultivo (**Figura 21B**). Por otra parte, la cuantificación de IFN $\gamma$  demuestra, que mientras los linfocitos UT producen altos niveles de esta molécula frente a la presencia de un estímulo alogénico, los linfocitos CD3US6 generan en la mayoría de los casos una cantidad de IFN $\gamma$  no detectable o mucho menor a la producida por los linfocitos control (**Figura 21C**).

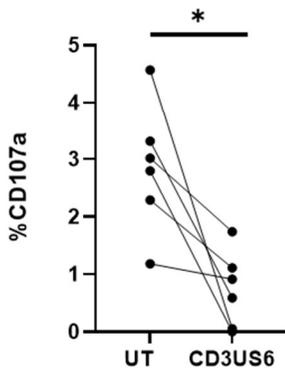
De esta manera, los resultados obtenidos indican que la disminución de CD3 en superficie mediada por el intracuerpo CD3US6 es suficiente para atenuar e incluso evitar la aloreactividad de los linfocitos T en ensayos *in vitro*.

A

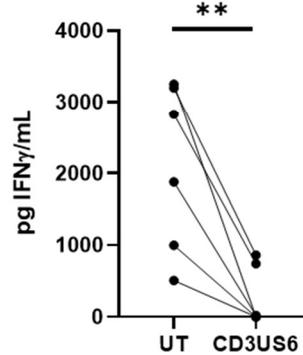


B

Degranulación frente a moDC alogénicas



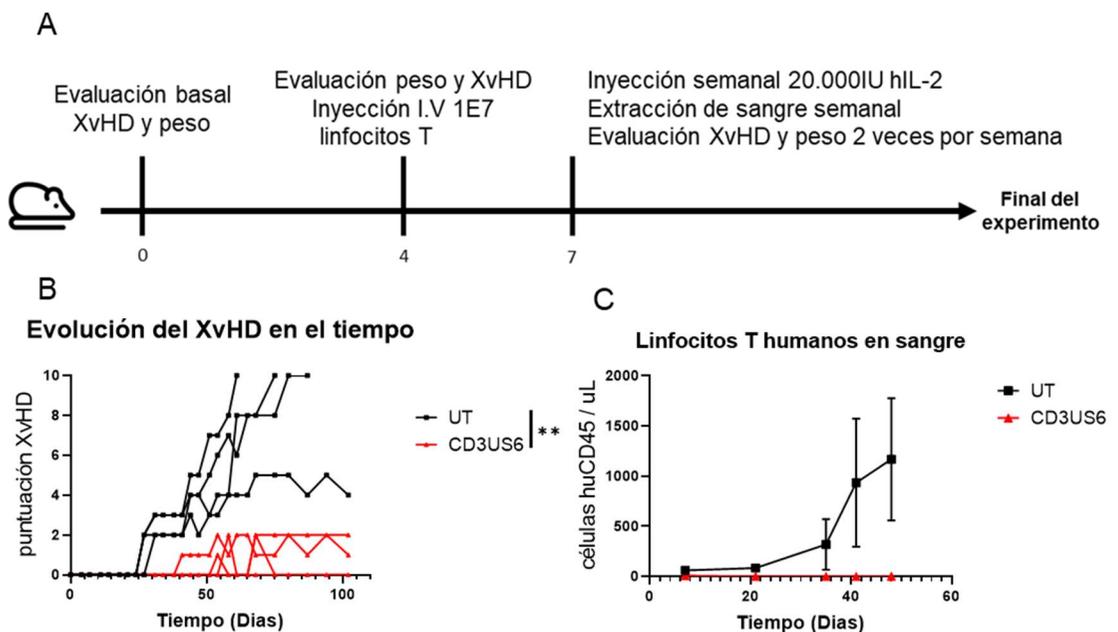
C

Producción de IFN $\gamma$  a los 5 días

**Figura 21 Determinación del efecto de CD3US6 sobre el aloconocimiento A.** Estrategia de gating para determinar la presencia de células reactivas, a través de la expresión de la molécula CD107a. **B.** Gráfico que muestra el análisis conjunto ( $n=6$  donantes independientes) de linfocitos T CD107a+ en las condiciones UT y CD3US6. **C.** Gráfico que muestra la presencia de IFN $\gamma$  en el sobrenadante del co-cultivo, expresado como picogramos de IFN $\gamma$  por mL de sobrenadante ( $n=6$  donantes independientes). \*\* $p<0.0021$ , \* $p<0.0332$

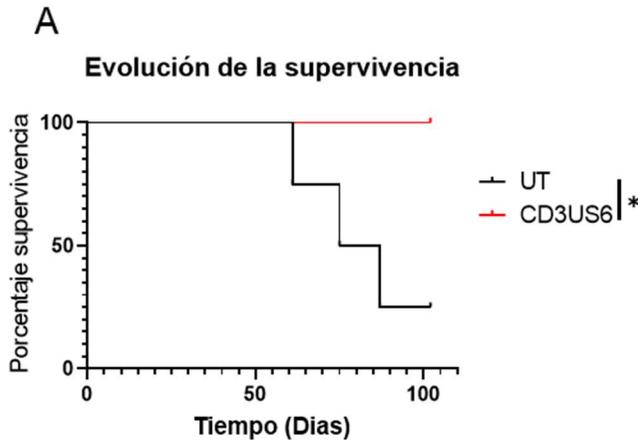
### 1.6.4.-Estudio del GvHD en un modelo murino

Viendo la eficacia de CD3US6 para disminuir la respuesta alógena *in vitro* por parte de los linfocitos T, procedimos a realizar experimentos *in vivo* con un modelo murino de ratones inmunosuprimidos de la cepa NSG. En este experimento, se valoró durante los 4 primeros días el estado de salud de los ratones, así como su peso. Al quinto día se administraron por vía intravenosa un total de 10M linfocitos UT o CD3US6 y se hizo un seguimiento semanal del estado de salud hasta el final del experimento (**Figura 22A**). El estado de salud de los ratones, así como la detección en sangre de linfocitos T humanos, sugieren que los linfocitos UT son capaces de reconocer los xenoantígenos del ratón. Vemos como se promueve así su proliferación, y la generación de una respuesta contra los tejidos del ratón, la cual se refleja en la aparición de los síntomas asociados a un XvHD. Mientras que los linfocitos T CD3US6, muestran muy poca capacidad de proliferación, y solo se observa la aparición de síntomas leves asociados a un XvHD (**Figura 22B y C**).



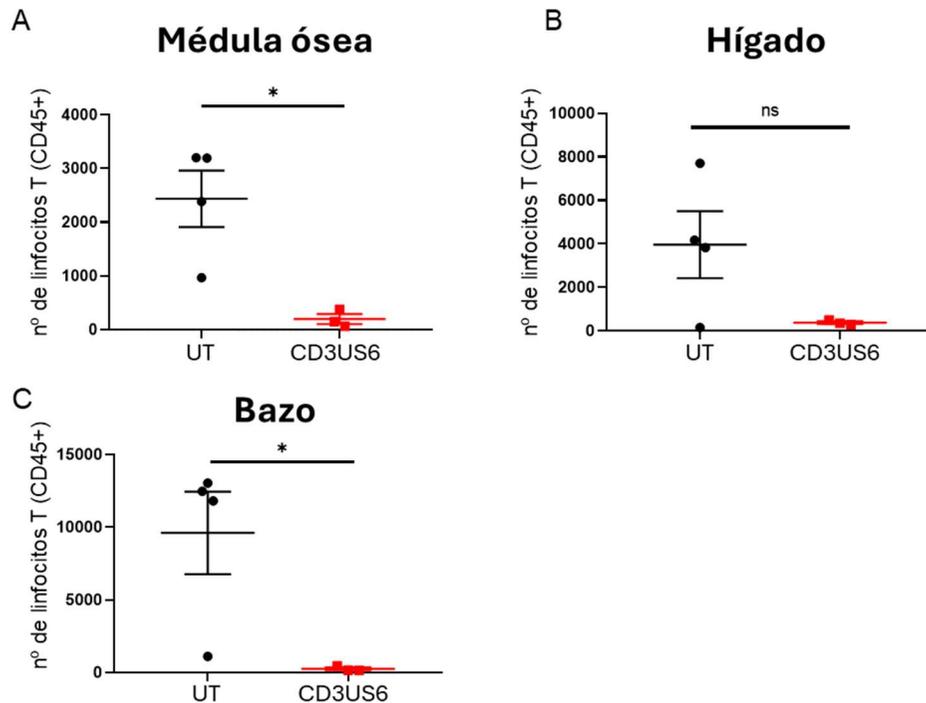
**Figura 22 Estudio de la aloreactividad en un modelo murino A.** Esquema de la línea temporal del experimento. **B.** Gráfico que muestra la evolución de la sintomatología de XvHD a lo largo del tiempo (n=4 ratones). **C.** Gráfico que muestra el número de linfocitos T humanos en sangre a lo largo del tiempo (n=4 ratones). \*\* $p < 0.0021$

Durante el experimento, aquellos ratones que alcanzaban un XvHD severo fueron sacrificados por motivos éticos. Una vez evaluada la supervivencia a largo plazo de los ratones, vemos que el grupo CD3US6 tiene una mayor supervivencia que el grupo control con linfocitos UT (**Figura 23**).



**Figura 23** Curva de supervivencia de los dos grupos experimentales ( $n=4$  ratones).  $*p<0.0332$

Además, se hizo un análisis post-mortem de la infiltración de los linfocitos T en algunos tejidos del ratón. Para ello se diseccionaron los ratones y se extrajeron la médula ósea, el bazo y el hígado. El análisis por citometría de flujo muestra un mayor número de linfocitos T humanos infiltrados en los tejidos del grupo de ratones administrados con linfocitos UT, mientras que la infiltración en los ratones administrados con linfocitos CD3US6 es muy baja o inexistente (debido al fallecimiento súbito por causas independientes a las condiciones experimentales de uno de los ratones del grupo CD3US6 se decidió parar el experimento en el último día en que se habían realizado las mediciones de ese sujeto. Además, no se pudieron lograr extraer los órganos del sujeto para su análisis post-mortem, por ello tan solo figuran los resultados de los otros tres ratones) (**Figura 24A-C**).

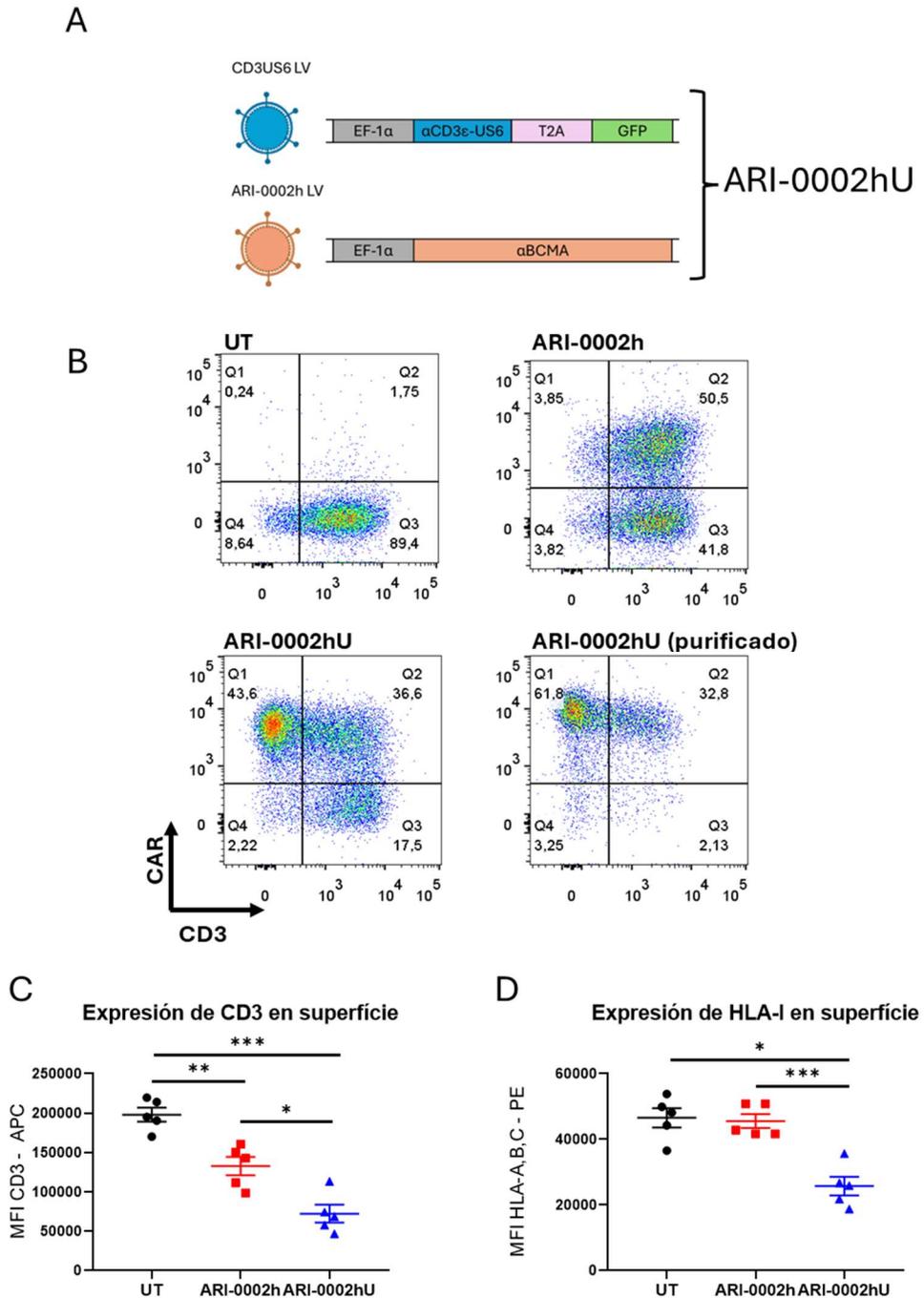


**Figura 24 Análisis de la infiltración de linfocitos T en órganos murinos A, B y C.** Gráficos que muestran el análisis conjunto del número normalizado de linfocitos T humanos en médula ósea, hígado y bazo de los ratones ( $n=3-4$  ratones).  $**p<0.0021$ ,  $*p<0.0332$

### 1.7. Combinación de CD3US6 con un CAR-T de segunda generación

Finalmente, procedimos a evaluar si la combinación de CD3US6 permitiría la expresión correcta de un CAR en el mismo linfocito T, y si esta combinación era funcional.

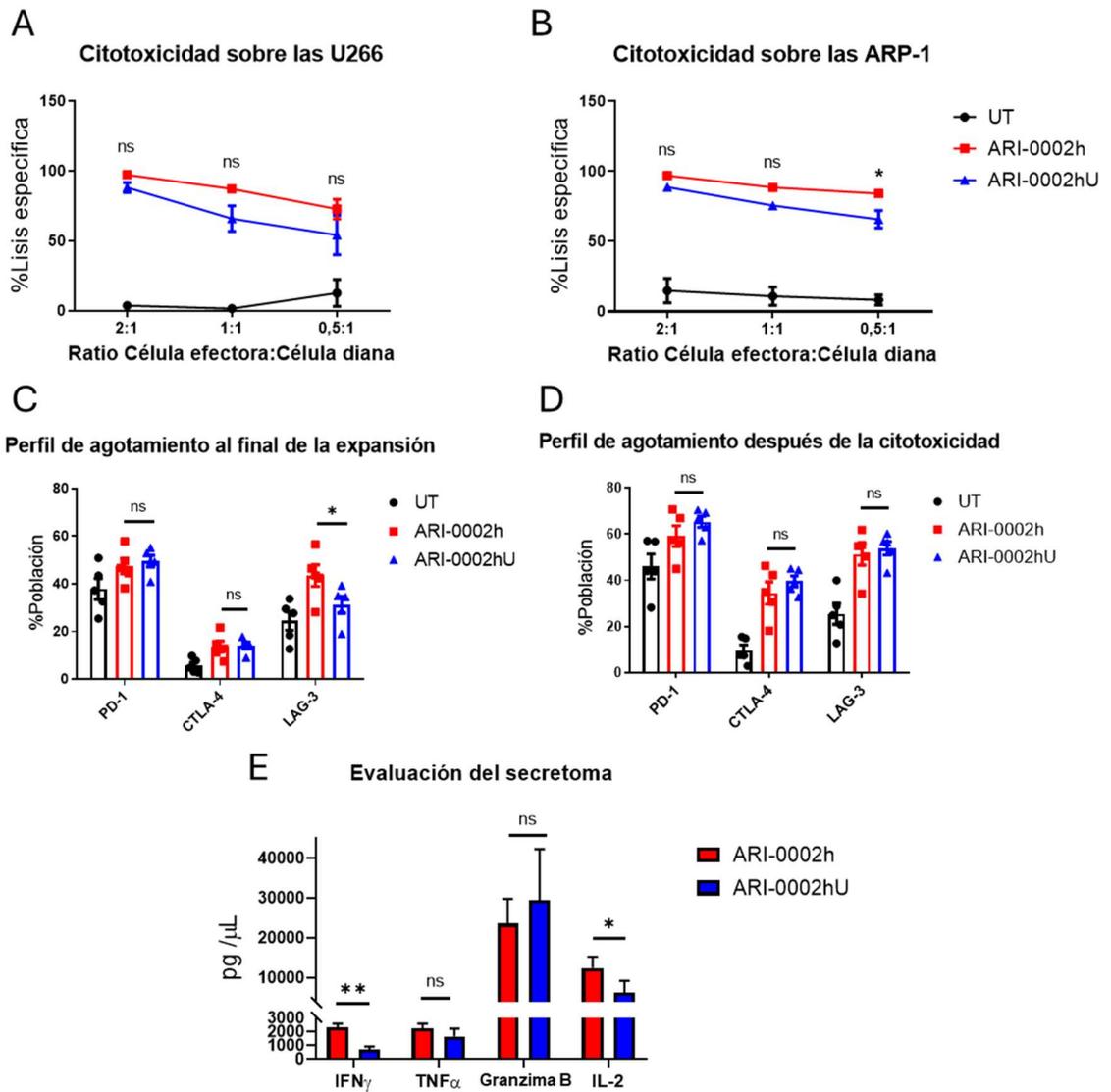
Para ello, realizamos una estrategia de cotransducción, en la que modificamos linfocitos T humanos para que expresasen el CAR ARI-0002h, un CAR de segunda generación dirigido contra el antígeno BCMA, y la proteína CD3US6 (ARI-0002hU) (**Figura 25A**). A través del análisis por citometría de flujo encontramos que éramos capaces de generar una población de linfocitos CAR-T con una expresión reducida de CD3 y HLA-I en su superficie (**Figura 25B- D**).



**Figura 25** Combinación de CD3US6 con un CAR-T de segunda generación. **A.** Diagrama que muestra la estrategia de co-transducción. **B.** Gráficos representativos de citometría de flujo que muestran la expresión de CD3 y CAR. **C y D.** Análisis de la expresión de CD3 y HLA-I en la superficie de los linfocitos UT, ARI-0002h y ARI-0002hU ( $n=5$  donantes independientes). \*\*\* $p<0.0002$ , \*\* $p<0.0021$ , \* $p<0.0332$ .

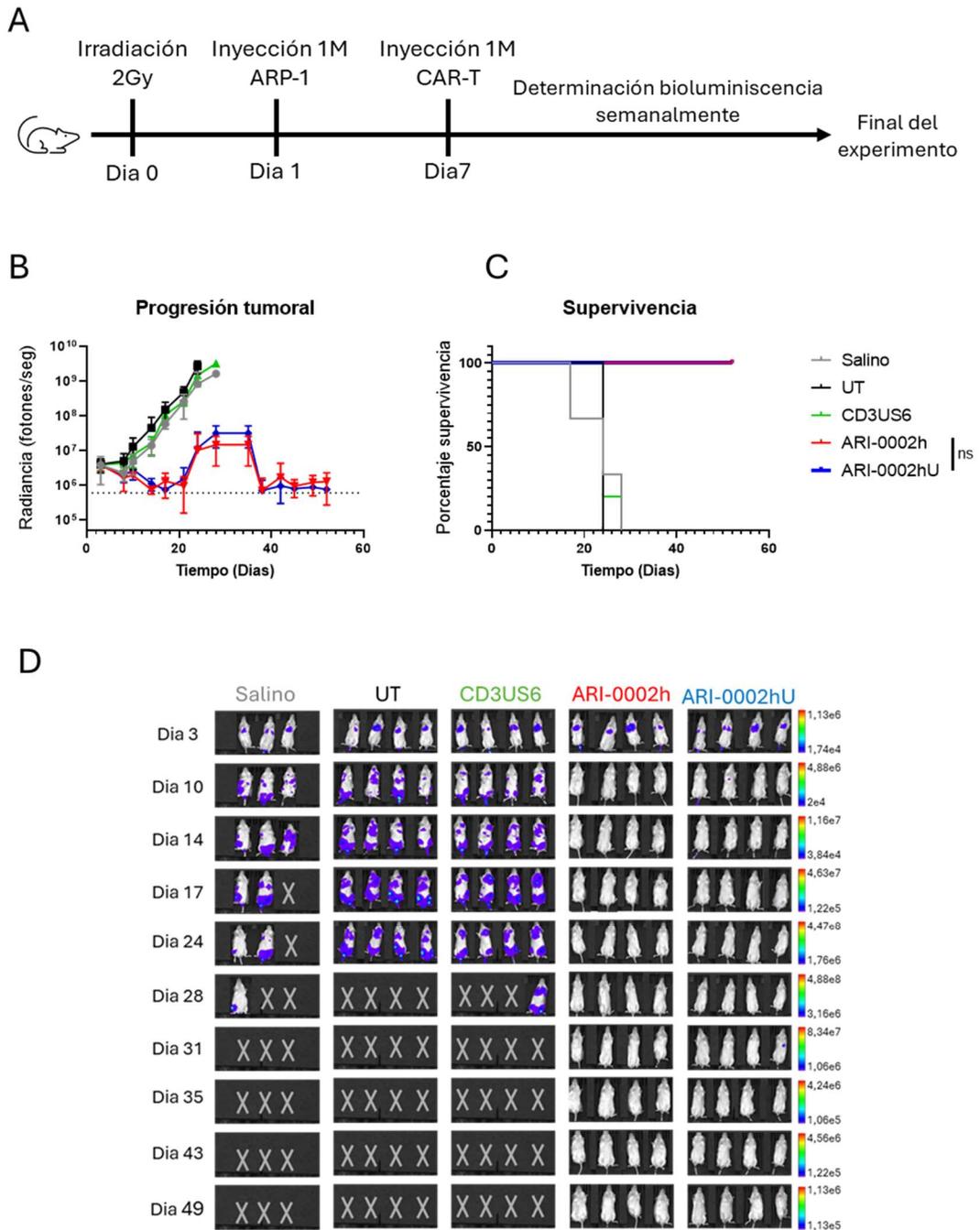
Con estos linfocitos ARI-0002hU realizamos ensayos de citotoxicidad contra las células diana ARP-1 y U266. Ambas líneas tumorales son un modelo de mieloma múltiple y expresan el antígeno BCMA en su superficie. Además, habían sido previamente modificadas para expresar los genes reporteros GFP y la luciferasa de luciérnaga. Estos ensayos de citotoxicidad se realizaron a través de co-cultivos en diferentes proporciones de células diana: células efectoras, y se evaluó la citotoxicidad a las 24 horas a través de la medida de la luminiscencia. En los resultados obtenidos se muestra como los linfocitos ARI-0002h tienen una tendencia a tener un mayor efecto citotóxico que los linfocitos ARI-0002hU, pero en la mayoría de las condiciones, esta diferencia no es significativa (**Figura 26A y B**).

Además, en este ensayo también evaluamos si la expresión de CD3US6 modificaba la expresión de marcadores de agotamiento o la capacidad de secretar algunas citocinas proinflamatorias en los linfocitos CAR-T. Los resultados muestran como la expresión de marcadores de agotamiento no difiere entre los linfocitos ARI-0002h y los linfocitos ARI-0002hU, ni al final de la expansión, ni después del ensayo de citotoxicidad (**Figura 26C y D**). En cuanto a la secreción de citocinas, se cuantificó la presencia de IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  y Granzima B a través de un ELISA en el sobrenadante del ensayo de citotoxicidad. A partir de los resultados obtenidos se aprecian una reducción significativa en la secreción de las citocinas IFN $\gamma$  e IL-2 por parte de los CAR-T ARI-0002hU (**Figura 26E**).



**Figura 26 Estudio funcional de los linfocitos ARI-0002hU.** **A y B.** Gráficos que muestran la citotoxicidad, expresada como el porcentaje de lisis específica, de los linfocitos UT, ARI-0002h y ARI-0002hU frente a las líneas tumorales U266 y ARP-1 ( $n=5$  donantes independientes). **C y D.** Análisis del porcentaje de linfocitos que expresan marcadores de agotamiento al final de la expansión y después del ensayo de citotoxicidad ( $n=5$  donantes independientes). **E.** Análisis conjunto de la cuantificación de las citocinas proinflamatorias IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , Granzima B e IL-2 liberadas por los linfocitos CAR-T después de un ensayo de citotoxicidad ( $n=5$  donantes independientes). \*\* $p<0.0021$ , \* $p<0.0332$

Finalmente, procedimos a evaluar si la capacidad funcional de los linfocitos ARI-0002hU tampoco se veía alterada en un modelo *in vivo*. Para ello, se utilizaron ratones de la cepa NSG. Estos ratones fueron sometidos a una irradiación de cuerpo completo, previamente a ser inyectados con 1 millón (M) de células ARP-1. Una vez comprobado que las células tumorales habían injertado en el ratón, se procedió a administrar a los ratones con una dosis de 1M de linfocitos ARI-0002h o ARI-0002hU. A partir del día de administración se realizó un seguimiento de la progresión de la enfermedad a través de la medida de la luminiscencia obtenida mediante el equipo IVIS (**Figura 27A**). Los resultados muestran como en los grupos de animales administrados con las condiciones control (Salino, linfocitos UT o linfocitos CD3US6) hay una rápida progresión de la enfermedad, y tuvieron que ser sacrificados rápidamente. En cambio, los grupos de ratones administrados con los linfocitos ARI-0002h o ARI-0002hU son capaces de controlar la enfermedad de manera similar, sin observarse una alteración en la función de los linfocitos ARI-0002hU en comparación a los ARI-0002h (**Figura 27B-D**).



**Figura 27 Determinación de la funcionalidad de los linfocitos ARI-0002hU en un modelo murino. A.** Esquema temporal que muestra el curso del experimento. **B.** Gráfico que muestra la progresión tumoral, expresada a través del valor de radiancia emitida por los ratones ( $n=3-4$  ratones). **C.** Curva de supervivencia de los diferentes grupos experimentales. **D.** Imágenes representativas de la progresión tumoral en los diferentes grupos experimentales.

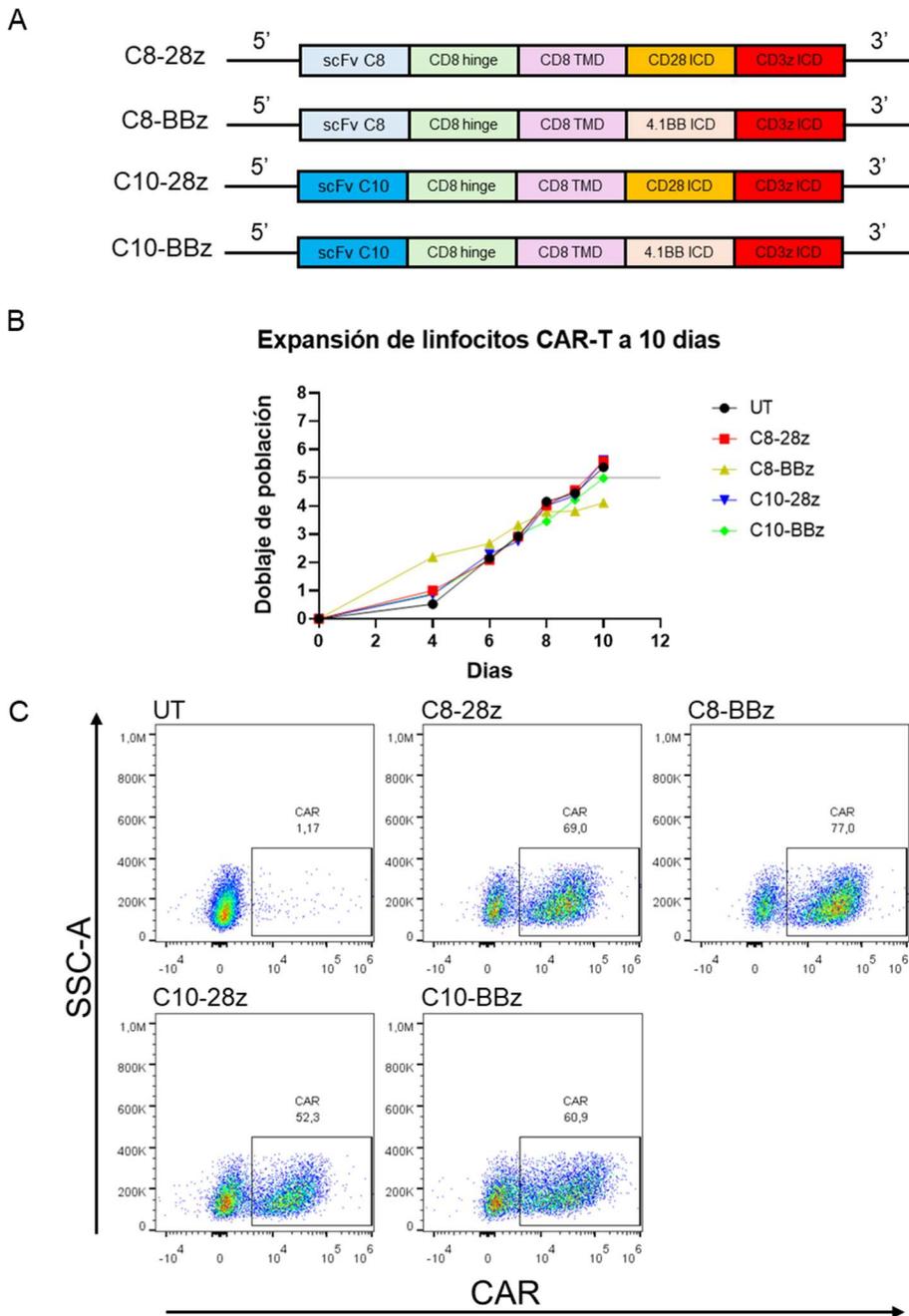
## 2.- Desarrollo de una terapia CAR-T dirigida a SARS-CoV-2

### 2.1.-Diseño de CAR de segunda generación contra la proteína S del SARS-CoV-2

Para realizar el diseño de los CAR de 2ª generación contra el SARS-CoV-2, utilizamos las secuencias de los anticuerpos C8 y C10. Estos anticuerpos fueron desarrollados a través de tecnología de *phage display* a partir de librerías de anticuerpos humanos y fueron seleccionados para reconocer el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del virus. Las secuencias fueron amablemente cedidas por las doctoras Mireia Pelegrín y Mar Naranjo del *Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy, Francia*.

Con tal de generar dos scFv con los anticuerpos C8 y C10, se unieron las secuencias de la región variable pesada y ligera a través de un conector basado en cuatro repeticiones de la secuencia aminoacídica Gly-Ser-Ser-Ser. Estos scFv fueron posteriormente clonados en el plásmido de expresión pCCL-EF1 $\alpha$  utilizando las enzimas de restricción MluI y XbaI, para poder intercambiar el scFv dirigido contra CD19 por los scFv derivados de los anticuerpos C8 y C10. Además, a partir de estos scFv generamos 2 constructos CAR diferentes, bien con el dominio de coestimulación basado en la molécula 4-1BB o bien en la molécula CD28, obteniendo así 4 plásmidos diferentes (**Figura 28A**).

A partir de estos plásmidos se hizo la producción de vectores lentivirales de 3ª generación. Con tal de evaluar si la expresión de estos CAR afectaba o no al crecimiento de los linfocitos T hicimos un protocolo de expansión a 10 días. Los resultados recogidos de diferentes expansiones demuestran como el crecimiento de los linfocitos T no se ve afectado respecto al control, a excepción de aquellos linfocitos que expresan el CAR C8-BBz, los cuales no consiguen llegar al límite mínimo de expansión (**Figura 28B**). Debido a esta limitación, decidimos prescindir de este CAR-T para los ensayos *in vitro*. El último día de expansión también procedimos a evaluar a través de citometría de flujo si la molécula CAR se expresaba correctamente en superficie. Los resultados obtenidos de diferentes expansiones muestran que los diferentes CAR se expresan correctamente en la superficie de los linfocitos transducidos (**Figura 28C**).



**Figura 28** Diseño de CAR de segunda generación contra la proteína S del SARS-CoV-2 A. Diagrama esquemático de los 4 CAR generados, C8-28z, C8-BBz, C10-28z y C10-BBz. **B.** Gráfico representativo que muestra la proliferación de los diferentes linfocitos CAR-T durante 10 días, expresada como doblajes de población. **C.** Gráficos representativos de citometría de flujo, que muestran la correcta expresión de los diferentes CAR en la superficie de linfocitos T humanos.

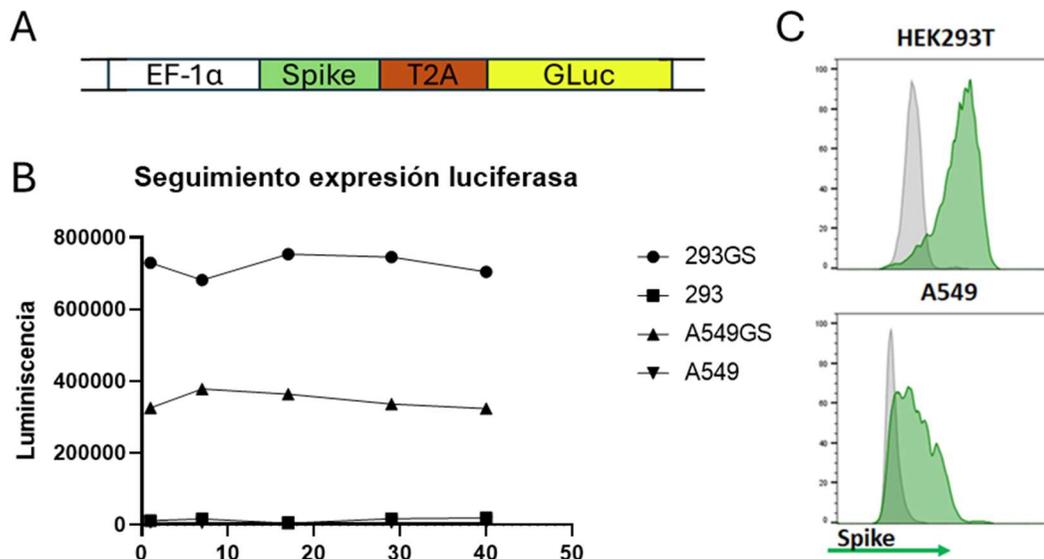
## **2.2.-Generación de una línea celular modelo infección de SARS-CoV-2**

Para poder evaluar la correcta funcionalidad de los linfocitos CAR-T, necesitábamos un modelo celular de infección por SARS-CoV-2. Debido a limitaciones técnicas asociadas a la bioseguridad, que nos impedían trabajar con el virus real en nuestro centro, procedimos a buscar una alternativa.

Generamos un transgén que codifica para la proteína S de la cepa original del virus, seguido de un dominio autoescindible T2A y la secuencia codificante para la luciferasa Gaussia, que servía como gen reportero. Este transgén fue clonado en un plásmido de expresión pCCL-EF1 $\alpha$  (**Figura 29A**). Una vez generados los vectores lentivirales, se transdujeron dos líneas celulares, la línea de riñón humano HEK293T y la línea de adenocarcinoma de pulmón A549.

Con tal de conseguir una línea que no perdiese la expresión a lo largo del tiempo tuvimos que hacer una dilución límite para aislar clones únicos a partir de los cuales conseguir una línea estable. Para mirar la estabilidad de la expresión del gen a lo largo del tiempo hicimos ensayos de bioluminiscencia. Los resultados obtenidos, muestran una producción de luminiscencia estable a lo largo del tiempo, en ambas líneas celulares (**Figura 29B**).

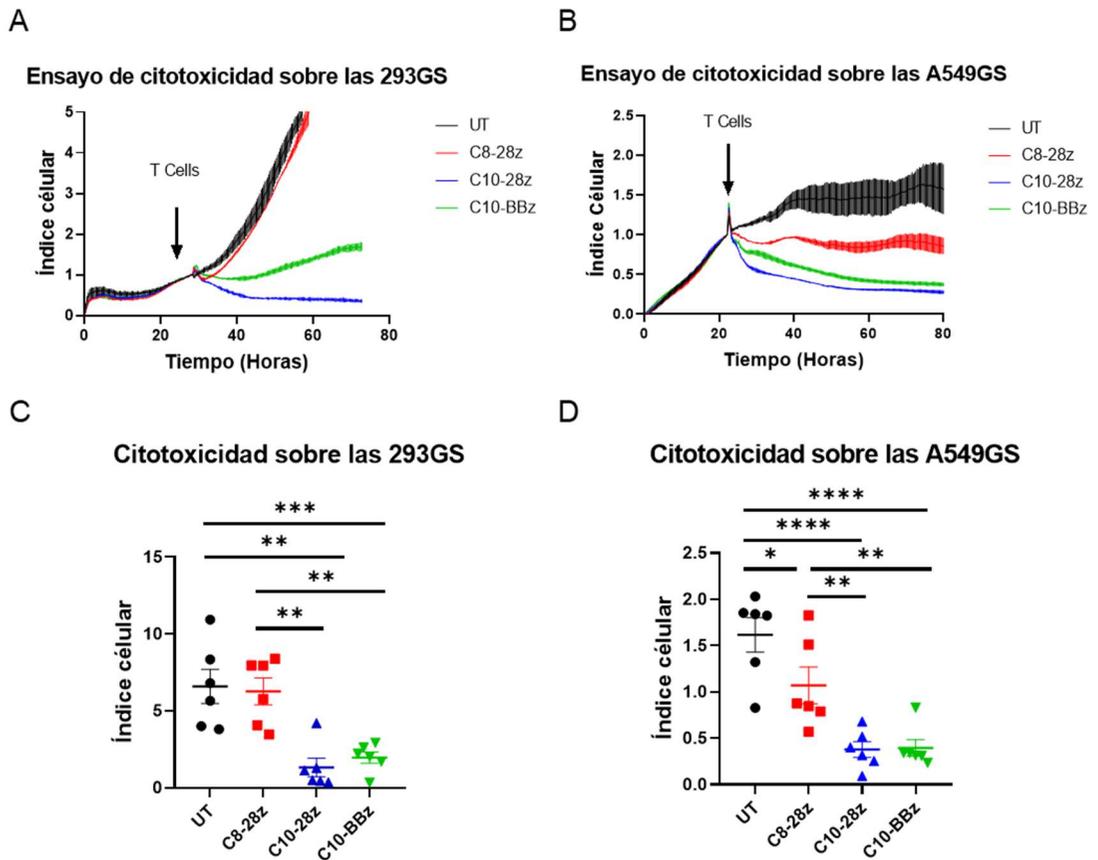
Finalmente, fuimos capaces de detectar la expresión de la proteína S en la superficie de los clones seleccionados a través de citometría de flujo. De esta manera conseguimos tener dos líneas celulares que expresaban el transgén, las cuales rebautizamos como 293GS y A549GS. Además, comparando la expresión de la proteína S en la superficie de ambas líneas celulares, vimos que la línea A549GS tenía un menor nivel de expresión que la 293GS, obteniendo así dos modelos, uno con una alta expresión del antígeno contra el que va dirigido el CAR y otra con una expresión media (**Figura 29C**).



**Figura 29 Generación de un modelo de infección in vitro.** **A.** Diagrama que muestra el transgén que codifica para la proteína Spike y para el gen reportero de la luciferasa Gaussia. **B.** Gráfico que muestra la emisión de luminiscencia de las líneas 293T, A549, 293GS y A549GS. **C.** Histogramas de citometría de flujo que muestran la expresión de la proteína Spike en la superficie de las líneas A549 y HEK293T.

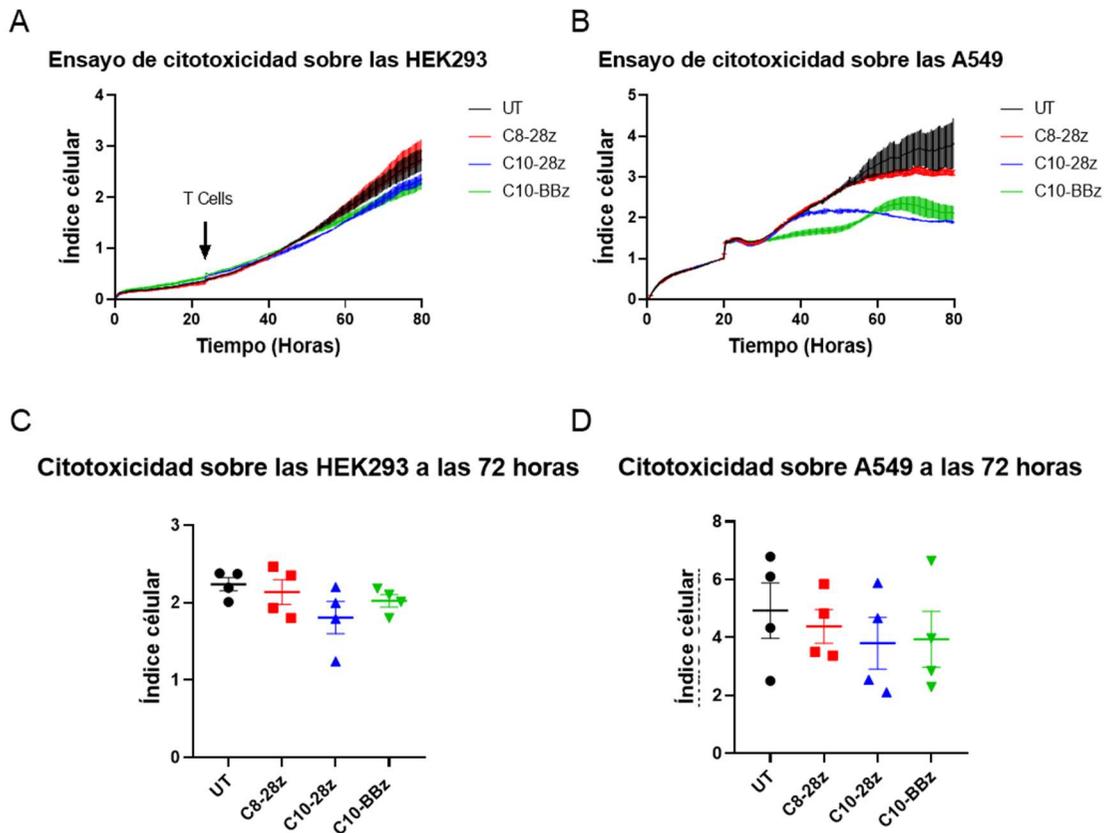
### 2.3.-Evaluando la capacidad funcional de los CAR-T contra SARS-CoV-2

Con tal de probar el efecto citotóxico de los diferentes CAR-T hicimos ensayos de citotoxicidad. Para ello utilizamos el Xcelligence, el cual nos permite determinar la cantidad de células diana (293GS o A549GS) en el pocillo a través de la lectura de la impedancia (**Figura 30A y B**). Los resultados obtenidos después de realizar múltiples ensayos de citotoxicidad demuestran que los linfocitos CAR-T que derivan del anticuerpo C10 son capaces de reconocer y eliminar a las 293GS, mientras que el CAR-T C8-28z no es capaz de mediar un efecto citotóxico significativo frente a esta línea (**Figura 30C**). En cuanto a la citotoxicidad frente a las A549GS, se observa como todos los CAR-T son capaces de reconocer y eliminar las células diana. En este caso, se observa cómo la citotoxicidad mediada por los CAR-T C10-28z y C10-BBz es mayor que la del C8-28z (**Figura 30D**). Cabe destacar que no se observan diferencias en la citotoxicidad entre los CAR-T C10-28z y C10-BBz pese a diferir en su dominio de coestimulación (**Figura 30C y D**).



**Figura 30 Evaluación funcional de los linfocitos CAR-T contra SARS-CoV-2 A y B.** Gráficos que muestran la evolución del índice celular en ensayos de citotoxicidad de los linfocitos CAR-T contra las líneas 293GS y A549GS. **C y D.** Análisis agrupado de la citotoxicidad ( $n=6$  donantes independientes) a las 72 horas frente a las líneas 293GS y A549GS.  $***p<0.0002$ ,  $**p<0.0021$ ,  $*p<0.0332$

Una vez evaluada la actividad citotóxica, nos aseguramos de que esta realmente era causada por el reconocimiento de la proteína S en la superficie de las células. Para ello, hicimos de nuevo ensayos de citotoxicidad utilizando también el Xcelligence. En este caso, las células diana eran las HEK293T y las A549 sin modificar (**Figura 31A y B**). Los resultados obtenidos, muestran como los linfocitos CAR-T, ya sea aquellos que derivan del anticuerpo C8 o del anticuerpo C10, no ejercen ninguna toxicidad frente a las líneas celulares sin modificar. Por tanto, el efecto visto con las líneas modificadas es atribuible al reconocimiento específico de la proteína S por parte de los linfocitos CAR-T (**Figura 31C y D**).

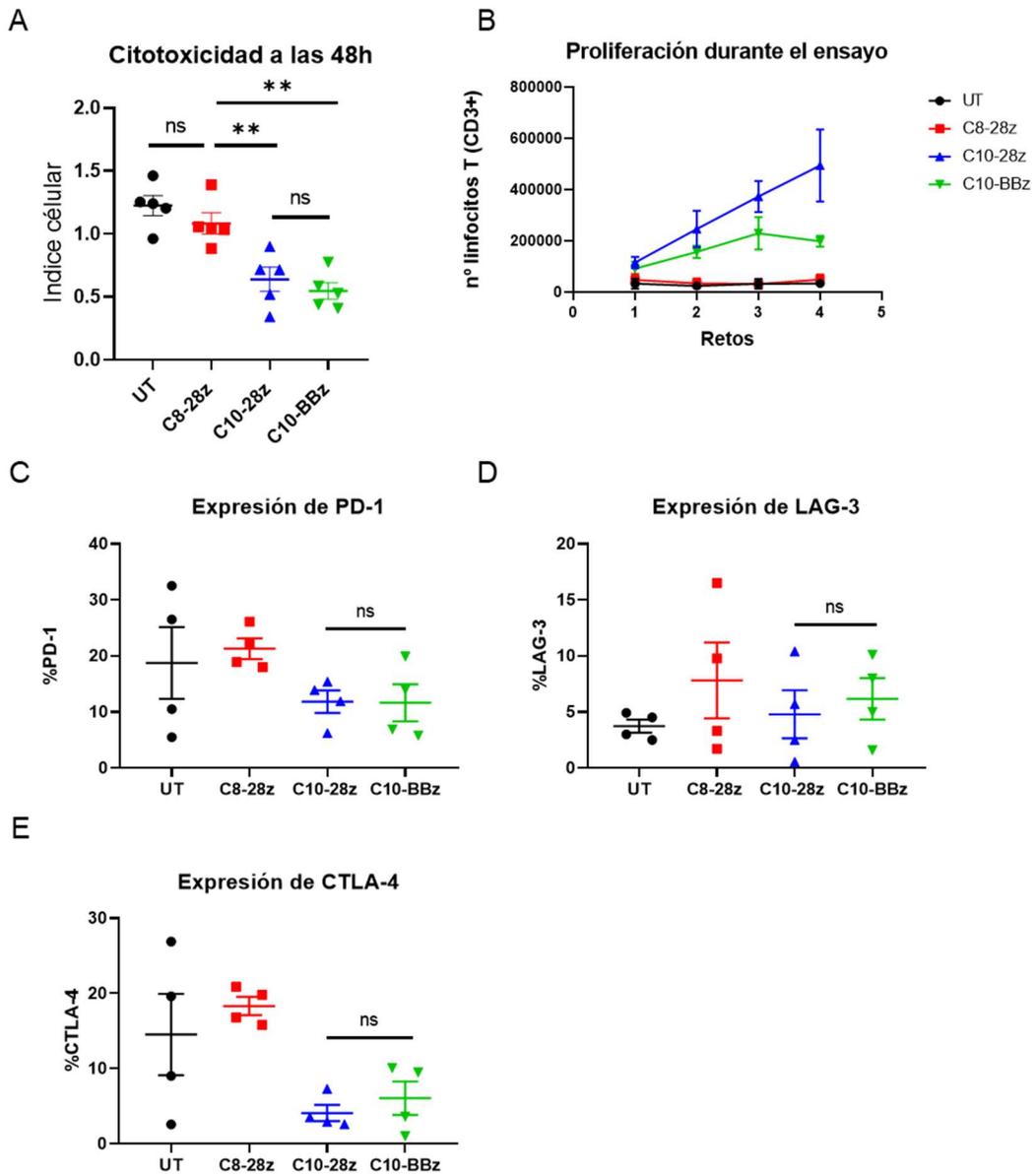


**Figura 31 Evaluación de la especificidad de los linfocitos CAR-T contra SARS-CoV-2. A y B.** Gráficos que muestran la evolución del índice celular en ensayos de citotoxicidad de los linfocitos CAR-T contra las líneas HEK293T y A549. **C y D.** Análisis agrupado de la citotoxicidad ( $n=4$  donantes independientes) a las 72 horas frente a las líneas 293GS y A549GS.

Finalmente, realizamos un experimento de citotoxicidad consecutiva con células diana para ver si los CAR-T podían mantener su actividad citotóxica durante un largo período de tiempo. Para ello, enfrentamos los CAR-T a 4 retos consecutivos con células diana A549GS, evaluando la capacidad citotóxica de los CAR-T en el último reto utilizando el Xcelligence. Los resultados muestran cómo después de 3 retos consecutivos, los CAR-T C10-28z y C10-BBz son capaces de mantener una actividad citotóxica significativa frente a las A549GS, mientras que los CAR-T C8-28z no. Además, siguen sin observarse diferencias entre los CAR C10-28z y C10-BBz a nivel de citotoxicidad (**Figura 32A**).

Durante este experimento también evaluamos el crecimiento de los linfocitos al final de cada reto. Los datos obtenidos muestran como los CAR C10-28z y C10-BBz son

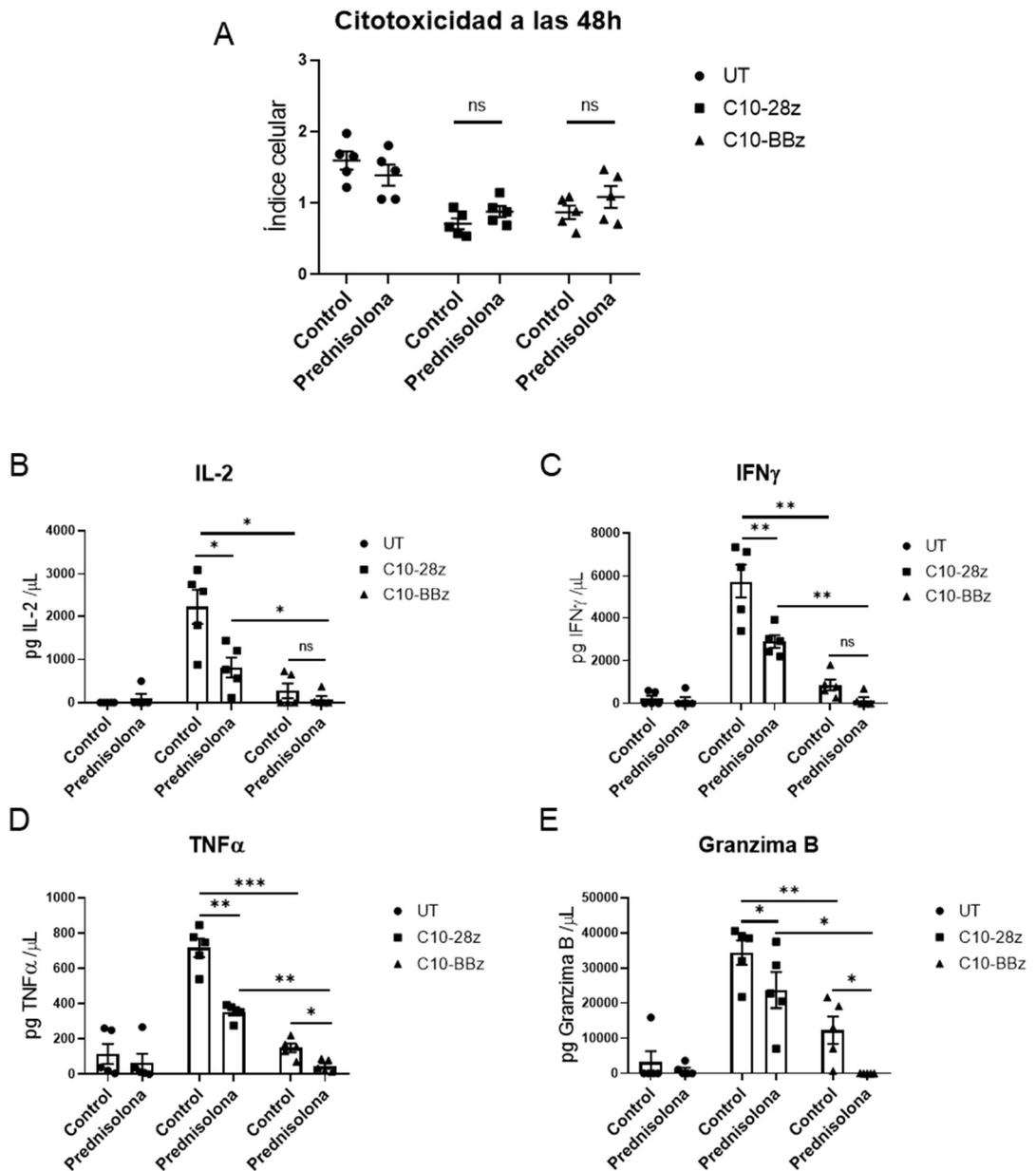
capaces de proliferar durante los diferentes retos mientras que el C8-28z no es capaz de hacerlo. También se observa una tendencia del CAR C10-28z a proliferar más en comparación al C10-BBz durante el experimento (**Figura 32B**). Además, evaluamos el perfil de agotamiento a través de citometría de flujo una vez finalizado el último reto, y no se encontraron diferencias significativas entre los CAR C10-28z y C10-BBz pese a tener dominios de coestimulación diferentes (**Figura 32C-E**).



**Figura 32 Determinación de la persistencia in vitro.** **A.** Análisis conjunto de la citotoxicidad frente a la línea A549GS a las 48 horas en el cuarto reto ( $n=5$  donantes independientes). **B.** Gráfico que muestra la proliferación de los linfocitos CAR-T, expresado a partir del número de eventos CD3+, al final de cada reto ( $n=5$  donantes independientes). **C, D y E.** Gráficos que muestran la expresión de los marcadores de agotamiento PD-1, LAG-3 y CTLA-4 en los linfocitos T al final del ensayo de persistencia ( $n=4$  donantes independientes).  $**p<0.0021$ .

## 2.4.- Citotoxicidad en presencia de fármacos inmunosupresores

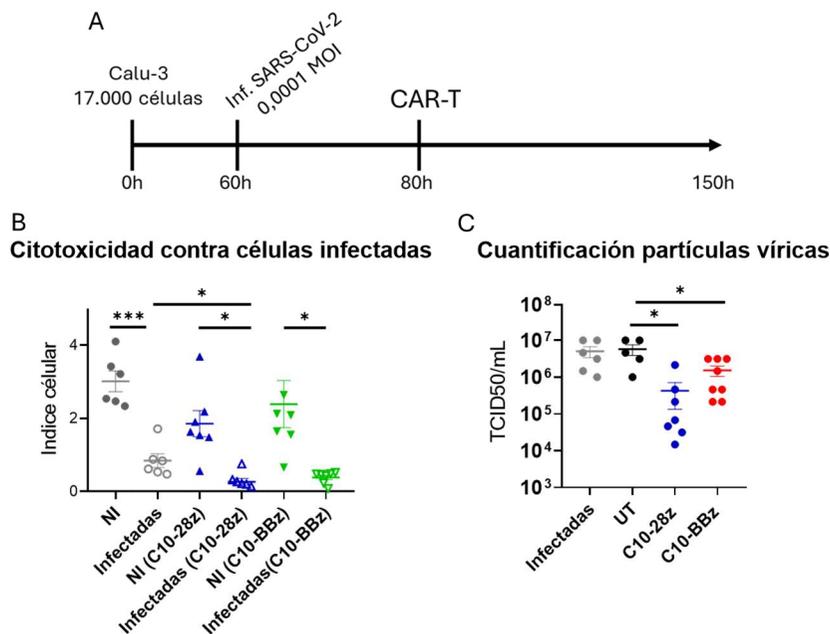
Debido a que una parte importante de la población en riesgo son pacientes que han recibido un trasplante de órgano sólido, evaluamos los posibles efectos que puedan tener los fármacos inmunosupresores que son administrados de manera sistémica a estos pacientes. Para ello, realizamos ensayos funcionales en presencia de prednisolona, un inmunosupresor de amplio espectro. En los ensayos pudimos ver que la presencia de prednisolona no generaba diferencias significativas en la citotoxicidad mediada por los linfocitos CAR-T a las 48 horas (**Figura 33A**). También procedimos a cuantificar la secreción de diferentes citocinas proinflamatorias implicadas en la respuesta de los linfocitos T. Los resultados muestran cómo los linfocitos CAR-T C10-28z presentan una mayor liberación de citocinas proinflamatorias en comparación a los C10-BBz. Además, se pone de manifiesto que la presencia de un agente inmunosupresor es capaz de mediar una reducción significativa sobre la cantidad de citocinas liberadas por los linfocitos CAR-T independientemente de su dominio de coestimulación. Pese a esta reducción, los CAR-T C10-28z siguen produciendo niveles considerables de citocinas proinflamatorias (**Figura 33B-E**).



**Figura 33 Citotoxicidad en presencia de fármacos inmunosupresores.** **A.** Análisis de la citotoxicidad a las 48 horas de los linfocitos CAR-T en ausencia o presencia de prednisolona ( $n=5$  donantes independientes). **B, C, D y E.** Análisis de la secreción de IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y Granzima B después de un ensayo de citotoxicidad en ausencia o presencia de prednisolona ( $n=5$  donantes independientes). \*\*\* $p<0.0002$ , \*\* $p<0.0021$ , \* $p<0.0332$

## 2.5.-Evaluando la capacidad citotóxica en un modelo de infección real

Pese a que los linfocitos CAR-T habían sido capaces de reconocer y eliminar las líneas celulares que expresan la proteína S en su superficie de forma artificial, decidimos evaluar si estos iban a ser capaces de reconocer la expresión de esta proteína en células infectadas por el virus. Para ello, realizamos ensayos de citotoxicidad *in vitro*. En estos, procedimos a infectar las células Calu-3 con el SARS-CoV-2. Una vez transcurrido un cierto tiempo que permitiese la propagación del virus a la mayoría de las células, se añadieron los linfocitos CAR-T a una proporción 5:1, y se evaluó la citotoxicidad a través del Xcelligence (**Figura 34A**). Los resultados de múltiples ensayos muestran un fuerte efecto citopático debido a la infección por el virus, que disminuye sensiblemente la cantidad de células durante el ensayo de citotoxicidad. Pero, se puede apreciar una reducción significativa en la cantidad de células infectadas cuando se añaden los linfocitos CAR-T (**Figura 34B**). Finalmente, procedimos a cuantificar la cantidad de partículas virales fruto del ciclo viral presentes en el sobrenadante de los pocillos al final de la citotoxicidad. Los resultados obtenidos muestran como la presencia de los linfocitos CAR-T es capaz de mediar una reducción significativa en la cantidad de partículas víricas en comparación a la condición control con linfocitos UT (**Figura 34C**).



**Figura 34 Evaluando la capacidad funcional de los linfocitos CAR-T en un modelo de infección real.** **A.** Diagrama que muestra el curso del experimento. **B.** Análisis de la citotoxicidad frente a células Calu-3 infectadas por el SARS-CoV-2 ( $n=6$  donantes independientes). **C.** Análisis de la cuantificación de partículas víricas después de un ensayo de citotoxicidad ( $n=6-8$  donantes independientes). \*\*\* $p<0.0002$ , \* $p<0.0332$ .

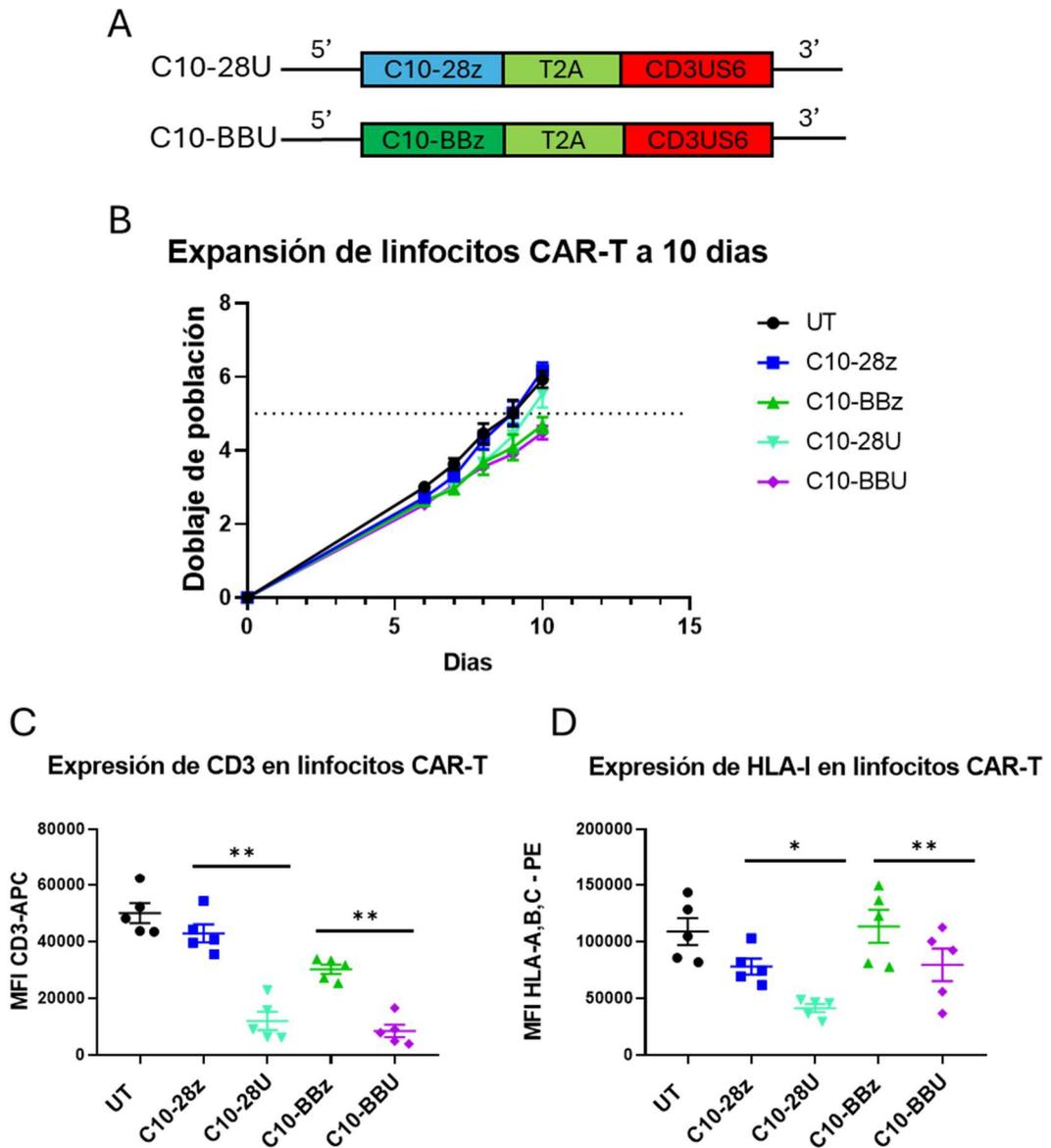
## 2.6.-Diseño y combinación de CD3US6 con el CAR contra SARS-CoV-2

El último objetivo en esta tesis doctoral era evaluar si la combinación de la expresión de la molécula CD3US6 y la expresión de un CAR podía llevarse a cabo para generar linfocitos T CD3- CAR+, para el uso de estos CAR-T de forma alogénica en el tratamiento de la COVID-19 como tratamiento listo al uso (*off-the-shelf*).

Para ello, sintetizamos una secuencia transgénica que contenía la secuencia de la proteína CD3US6 seguida de la secuencia de los CAR C10-28z y C10-BBz, separadas por un dominio autoescindible T2A. Permitiendo así la expresión de estas dos moléculas de forma independiente, pero bajo el mismo promotor. Esta secuencia fue clonada en un plásmido de expresión pCCL-EF1 $\alpha$  utilizando las enzimas de restricción MluI en el extremo 5' y BspEI en el extremo 3'. Una vez obtenidos los plásmidos, se generaron los vectores lentivirales de 3ª generación correspondientes (**Figura 35A**).

Posteriormente, se procedió a transducir linfocitos T humanos con estos vectores en un protocolo de expansión a 10 días. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de estos transgenes no afecta a la capacidad proliferativa de los linfocitos T (**Figura 35B**). Así mismo, al evaluar la expresión de estos por citometría de flujo, se

observa una menor expresión de CD3 y HLA-I en la superficie de los linfocitos CAR C10-28U y C10-BBU en comparación a los linfocitos CAR convencionales (**Figura 35C y D**). De esta manera, determinamos que la co-expresión de la molécula CD3US6 junto a los CAR C10-28z o C10-BBz es plausible y que no muestra ningún efecto negativo sobre los linfocitos transducidos.



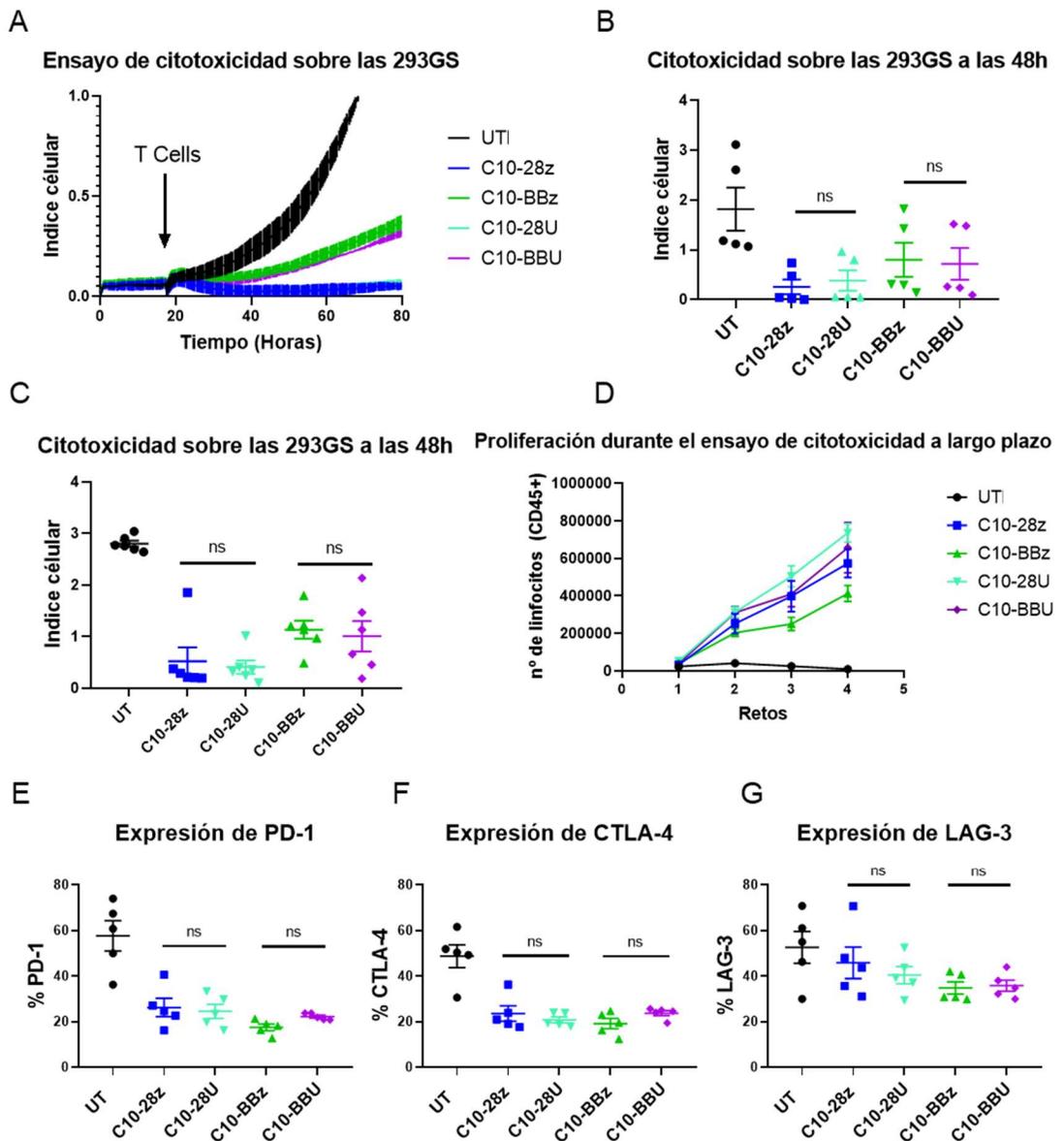
**Figura 35 Generación de linfocitos CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2. A.** Diagrama que muestra la secuencia transgénica para obtener los linfocitos CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2. **B.** Gráfico que muestra la expansión de los diferentes linfocitos CAR-T durante 10 días ( $n=5$  donantes independientes). **C y D.** Análisis de la expresión de CD3 y de HLA-I en los diferentes linfocitos CAR-T ( $n=5$  donantes independientes).  $**p < 0.0021$ ,  $*p < 0.0332$ .

## **2.7.-Evaluando capacidad citotóxica de los CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2**

El siguiente paso en esta investigación era determinar si el funcionamiento de los CAR-T se veía modificado por la retención de la molécula CD3ε. Para ello, procedimos a realizar ensayos de citotoxicidad para comparar los linfocitos CAR-T y los linfocitos CD3US6 CAR-T. Los ensayos de citotoxicidad realizados en el Xcelligence contra la línea celular 293GS muestran como los linfocitos CD3US6 CAR-T son capaces de mediar el reconocimiento de esta y ejercer un efecto citotóxico igual a los linfocitos CAR-T convencionales (**Figura 36 A y B**).

Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad consecutivos para ver si la retención de CD3ε afectaba a la capacidad citotóxica a largo plazo y a la proliferación de los linfocitos CD3US6 CAR-T. Los resultados muestran que los linfocitos CD3US6 CAR-T son capaces de mantener una citotoxicidad sostenida similar a la de los linfocitos CAR-T convencionales. Además, tampoco hay diferencias a nivel proliferativo (**Figura 36 C y D**).

Al final de este ensayo de reestimulación precedimos a evaluar la expresión de diferentes marcadores de agotamiento para ver si la retención del CD3ε provocaba algún efecto sobre la expresión de estas proteínas. Los resultados obtenidos a través de citometría de flujo muestran que hay expresión de marcadores de agotamiento a un nivel similar entre los linfocitos CAR-T y los linfocitos CD3US6 CAR-T (**Figura 36 E-G**).



**Figura 36 Evaluación funcional de los linfocitos CAR-T alogénicos contra SARS-CoV-2.** **A.** Gráfico que muestra la evolución del índice celular en un ensayo de citotoxicidad frente a las 293GS. **B.** Análisis de la citotoxicidad a las 48 horas frente a las 293GS ( $n=5$  donantes independientes). **C.** Análisis de la citotoxicidad a las 48 horas frente a las 293GS en el cuarto reto del ensayo de persistencia ( $n=5$  donantes independientes). **D.** Proliferación de los linfocitos CAR-T durante un ensayo de persistencia, expresado como el número de ventos CD45+ ( $n=5$  donantes independientes). **E, F, G.** Análisis de la expresión de marcadores asociados al agotamiento como PD-1, CTLA-4 y LAG-3 al final del ensayo de persistencia ( $n=5$  donantes independientes).

# Discusión



Las terapias basadas en linfocitos CAR-T han demostrado ser una opción terapéutica eficaz en pacientes con enfermedades oncohematológicas. En la mayoría de los ensayos clínicos, este tipo de terapia ha logrado una alta tasa de respuesta en pacientes clasificados como refractarios a tratamientos convencionales<sup>71,72,84,85</sup>.

A medida que el campo de las terapias CAR-T ha evolucionado, también han surgido limitaciones en su uso. Varios estudios clínicos han reportado que, debido a la forma de producción, algunos pacientes experimentaron progresión de su enfermedad o deterioro en su estado de salud durante la elaboración de la terapia, impidiéndoles beneficiarse de ella, simplemente por el factor temporal derivado de la obtención del producto autólogo<sup>261</sup>. Asimismo, se ha documentado que en determinados pacientes las células autólogas puede presentar tasas de expansión bajas, dificultando la obtención de las dosis terapéuticas óptimas. Además, la producción de estas terapias implica un gasto económico considerable, lo que globalmente limita su accesibilidad en muchos países<sup>261</sup>.

Para abordar estas limitaciones, se han realizado estudios que buscan desarrollar terapias alogénicas mediante el uso de células de donantes sanos. Conceptualmente, el enfoque alogénico podría mejorar la calidad del producto terapéutico (selección de donantes óptimos, homogeneidad de los productos), aumentar la accesibilidad a la terapia y reducir los tiempos hasta la administración<sup>131,199</sup>.

Actualmente, se han desarrollado diversas estrategias para generar terapias CAR de forma alogénica. La estrategia preferida es el uso de linfocitos T  $\alpha\beta$  modificados mediante edición génica para impedir la expresión del TCR y las moléculas de HLA en su superficie. Sin embargo, muchas de estas terapias no han avanzado hacia su aprobación por las agencias regulatorias debido entre otros motivos a preocupaciones sobre la seguridad de la edición génica, que puede generar efectos no deseados considerados peligrosos para el uso terapéutico<sup>228,231,237,238</sup>.

Por esta razón, numerosos estudios han explorado alternativas a la edición génica para generar terapias CAR alogénicas. Así han surgido estrategias como el uso de linfocitos NK, células T específicas del virus y linfocitos T de memoria entre otros. Aunque este tipo de células puede generar una terapia CAR efectiva, presentan ciertas limitaciones en comparación con los linfocitos T  $\alpha\beta$  como se ha descrito en el apartado anterior (ver sección 3.3.1-5).

En este contexto, las estrategias de retención de proteínas basadas en anticuerpos intracitoplasmáticos (intracuerpos) pueden ser una opción viable para la generación de terapias CAR alogénicas, hasta que se mejore la bioseguridad de las tecnologías de edición génica<sup>248</sup>. El concepto de intracuerpos tiene un origen antiguo, pero su aplicación en terapias CAR es relativamente reciente. Como se ha mencionado

anteriormente, el estudio de Dario Campana et.al. demostró que un intracuerpo contra CD3ε puede impedir la expresión de esta molécula y del TCR en la superficie de un linfocito T, evitando así que el linfocito t pueda generar un rechazo alógeno. Tradicionalmente, los intracuerpos del retículo endoplásmico se han generado fusionando anticuerpos a secuencias KKXX o KDEL, que facilitan el transporte retrógrado del AG al RE, evitando su expresión en la superficie<sup>244,245,248</sup>.

Una limitación importante de la estrategia empleada en el estudio del Dr. Campana es que los linfocitos T mantienen la expresión de sus moléculas de HLA, lo que permite que los linfocitos CAR-T sean rechazados por los linfocitos propios del receptor y la terapia CAR-T sea eliminada. De hecho, muchos estudios destacan el papel clave de inhibir la expresión de HLA para prolongar la persistencia de la terapia CAR-T alógena en el receptor<sup>248</sup>.

La expresión de proteínas virales caracterizadas previamente por inhibir de manera natural la expresión de moléculas de HLA y por poder retenerse en el RE se presenta como una opción potencialmente válida para evitar el uso de la edición génica en terapias CAR-T. Algunos estudios recientes muestran que la expresión de estas inmunoevasinas reduce significativamente la respuesta hacia ciertas regiones inmunogénicas de la molécula CAR, lo que sugiere que esta estrategia podría reducir la respuesta alógena<sup>260</sup>.

Los resultados obtenidos en la primera parte del estudio son consistentes con la literatura existente, donde se ha demostrado que la inmunoevasina US6 puede mediar una reducción significativa de HLA-I en linfocitos T humanos. Aunque se ha descrito que las inmunoevasinas E19K y US3 también pueden mediar este efecto, con ellos no observamos una reducción en HLA-I al expresarlas en linfocitos T humanos; de hecho, hasta ahora, la mayoría de los estudios no se han realizado en linfocitos T, que de manera intrínseca presentan un incremento en la expresión de HLA-I al ser activados. Es posible que las inmunoevasinas E19K y US3 no se expresen en cantidades suficientes mediante un vector lentiviral con un promotor EF1α, y no puedan compensar esta sobreexpresión de HLA-I en linfocitos T activados. Pero en cambio, la inmunoevasina US6 sí lo logra, debido a diversas características intrínsecas, que incluyen altos niveles de expresión<sup>257-259</sup>.

En cuanto a la generación de un intracuerpo utilizando la proteína US6 como motivo de retención, cabe destacar que, hasta ahora, los intracuerpos del RE se habían generado a partir de motivos KKXX y KDEL, que funcionan mediante transporte retrógrado del AG al RE. Aunque existe poca información sobre la proteína US6, se ha descrito que su mecanismo de retención en el RE no se basa en el transporte retrógrado, sino que se especula que se debe a su anclaje a la membrana a través de otros mecanismos propios de proteínas virales, o bien a través de su interacción con chaperonas<sup>262</sup>.

Nuestros resultados sobre la expresión de un intracuerpo basado en la proteína US6 muestran que la fusión de un scFv dirigido contra CD3 $\epsilon$  puede mediar una retención estable del complejo CD3, disminuyendo la expresión del TCR en la superficie, en línea con lo descrito previamente por el grupo del Dr. Campana. Además, la fusión del scFv en el extremo 5' de la proteína US6 no interfiere con su función, manteniendo la reducción en la expresión de HLA-I en la superficie de los linfocitos T.

Aunque los resultados muestran una reducción significativa, en la mayoría de los casos, sigue habiendo expresión superficial tanto de CD3 como de HLA-I. Esta disminución parcial no tiene que ser negativa para el objetivo buscado, puesto que puede ser suficiente de cara a evitar una alogenicidad deletérea. Por ello, decidimos realizar ensayos para evaluar la respuesta alogénica en estas condiciones US6-dependientes. Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que esta reducción en HLA-I y CD3 se acompaña de una disminución muy significativa de la respuesta alogénica. Es probable que esta menor respuesta se deba a que la señalización mediada por el complejo TCR no sigue un principio de "todo o nada". Según diversas teorías, la transducción del señal a través del TCR implica una competencia entre señales positivas y negativas. Es posible que la reducción en las moléculas implicadas en señales positivas (CD3, TCR) disminuya el total de señales positivas, aumentando el predominio de señales negativas y dificultando la generación de una respuesta alogénica<sup>263,264</sup>. Con la reducción de la expresión de HLA-I en la superficie ocurre un fenómeno similar: al no haber suficiente densidad de estas moléculas, es más difícil generar un input de señales positivas, y los linfocitos CD3US6 podrían estar protegidos del reconocimiento por parte de los TCR de los linfocitos T del receptor<sup>146</sup>. A su vez la baja expresión de HLA-I puede ser suficiente para bloquear la citotoxicidad mediada por las células NK, cuyos receptores inhibitorios pueden seguir siendo activados frente a bajos niveles de HLA-I.

Esta reducción no implica una desaparición de la respuesta alogénica, pero como hemos observado en los ensayos en modelos murinos, hay una clara reducción en la severidad de la enfermedad de injerto contra receptor, lo que sugiere que este sistema de retención se postula como una estrategia segura para su uso en terapia CAR-T alogénica. Además, si se presentara sintomatología leve de GvHD en pacientes tratados, esta podría ser más fácilmente abordable y tratable mediante fármacos en comparación con GvHD más severos<sup>265</sup>. Sin embargo, una de las limitaciones de nuestros ensayos es la pureza de las poblaciones de linfocitos CD3US6. Aunque en la mayoría de las expansiones de estos linfocitos modificados hemos obtenido un alto grado de transducción con el transgén, y hemos podido eliminar la mayoría de los linfocitos T no modificados mediante purificación por columna magnética o *cell sorting*, la población no es homogénea, presentando un espectro en la intensidad de la retención. Esta respuesta alogénica residual podría evitarse mediante métodos de

purificación más restrictivos que seleccionen linfocitos T con un alto grado de retención de la molécula.

Un aspecto que considerar dentro de esta estrategia de retención es que sigue habiendo una expresión residual de moléculas de HLA-I. Como ya se ha comentado en numerosos estudios, eliminar por completo la expresión de HLA-I en linfocitos T para terapia CAR alogénica hace que estos se vuelven susceptibles al reconocimiento por células NK, resultando en su eliminación. Por ello, se han diseñado estrategias que implican un mayor grado edición génica de los linfocitos T para expresar moléculas que impidan o limiten este reconocimiento por células NK. Sin embargo, es interesante lo ya planteado por Sadelain, quien describe que una expresión residual de HLA-I limita la respuesta alogénica y al mismo tiempo protege contra el reconocimiento por células NK. Según nuestros resultados, los linfocitos T mantienen una expresión residual de HLA-I en su superficie, y creemos que estamos observando este efecto protector descrito en nuestros linfocitos<sup>137,266,267</sup>. En los experimentos enfrentando células NK con linfocitos CD3US6, observamos una mayor activación de las células NK en comparación con los linfocitos no modificados, lo que indica que estos son más susceptibles al reconocimiento por células NK. Sin embargo, desde nuestro punto de vista, aunque el incremento de la reactividad es estadísticamente significativo, la verdadera diferencia cuantitativa no es extremadamente elevada. Como no incluimos un control *knock-out* para HLA-I en nuestros experimentos, hipotetizamos que la diferencia con linfocitos completamente desprovistos de esta molécula sería mucho mayor, por lo que nuestra estrategia podría ofrecer una ventaja respecto a la edición génica en términos de protección contra el rechazo por linfocitos NK, ayudando a prolongar el tiempo de vida medio de los linfocitos CAR-T CD3US6 en el receptor. No obstante, no descartamos buscar una estrategia que proporcione a los linfocitos T mayor protección frente a células NK. De hecho, se han descrito varias inmunoevasinas capaces de impedir el reconocimiento por parte de células NK en células infectadas, lo que podría dar lugar a una estrategia continuista en el uso de este tipo de moléculas para terapia CAR-T<sup>268</sup>.

En cuanto a la combinación con un CAR de segunda generación ya desarrollado, todos los resultados de los estudios preclínicos muestran que es posible obtener un alto porcentaje de linfocitos T CD3US6 que expresen el CAR. Además, no se observan cambios significativos en la capacidad proliferativa de estos linfocitos ni alteraciones en su fenotipo. Los diferentes ensayos funcionales muestran que la capacidad citotóxica del CAR ARI-0002h no se ve afectada por la retención de CD3ε, aunque se aprecian algunas diferencias en la secreción de citocinas, con una relativamente menor secreción por parte de los CAR que expresan CD3US6. Esto podría deberse a que la correcta expresión de las moléculas del complejo TCR tenga un efecto sinérgico sobre la señalización del CAR, potenciando su activación<sup>269,270</sup>. Sin

embargo, los estudios *in vivo* realizados en modelos murinos no muestran diferencias en el control de la enfermedad entre los CAR ARI-0002h y los ARI-0002hU. Por lo tanto, sería pertinente explorar si esta respuesta afecta la persistencia de los linfocitos CAR-T mediante experimentos más rigurosos. No obstante, los ensayos *in vitro* de restimulación con los CAR dirigidos contra SARS-CoV-2 no muestran diferencias significativas en la persistencia entre CAR-T convencionales y alogénicos.

Otro punto importante para destacar es que con la generación de este nuevo motivo de retención hemos demostrado que somos capaces de retener otras proteínas de interés como CD7, y que esta capacidad de retención sería extensible a prácticamente cualquier molécula que se exprese en la superficie celular. De hecho, hay un gran interés en evitar la expresión de ciertas moléculas en las terapias CART. Una de las principales razones es debido a la expansión del campo de esta terapia celular, donde recientemente se ha puesto el foco en el tratamiento de leucemias de estirpe T. La mayoría de los epítomos que se encuentran en los linfocitos T tumorales de estas enfermedades son también expresados en linfocitos T sanos, esto lleva a la aparición de un fenómeno denominado como fratricidio. El fratricidio implica una citotoxicidad dependiente del CART hacia los propios linfocitos CART durante su expansión lo que imposibilita la elaboración de terapias CART que vayan dirigidas hacia un antígeno expresado por los propios linfocitos T: De esta manera, con el uso de sistemas de retención de proteínas se podría llevar a cabo la retención de la molécula contra la que va dirigida el CAR, a la vez que se expresa este mismo, haciendo viable la producción de las terapias.<sup>271,272</sup>

Otro punto de interés, es a la hora de impedir la expresión de ciertas moléculas implicadas en el funcionamiento/fisiología de los linfocitos T, como pueden ser las proteínas implicadas en el proceso de agotamiento de los linfocitos T; como PD-1, CTLA\_4, TIGIT,... De forma similar a lo propuesto para el fratricidio, se podría mediar la retención de alguna de estas moléculas para conferir resistencia a los linfocitos CART a la presencia de los ligandos inhibitorios que están ampliamente expresados en el tumor, bien sea por las propias células tumorales, o por otros tipos celulares que conforman el microambiente tumoral.<sup>273</sup>

Pero la terapia CAR-T no solo tiene aplicabilidad como tratamiento de tumores, desde su uso en autoinmunidad, a las propuestas para enfermedades infecciosas, muchos son los usos potenciales de esta propuesta terapéutica.<sup>274</sup>

La COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ha llegado a provocar una de las pandemias más relevantes de los últimos años. Durante el pico de la pandemia, quedó en evidencia la limitada capacidad de los sistemas de salud a nivel mundial para enfrentar una crisis sanitaria de esta magnitud, lo que resultó en el colapso de la atención primaria en hospitales de todo el mundo. Se han contabilizado más de 7

millones de muertes a nivel mundial debido a esta enfermedad, aunque se aceptan que los números reales puedan ser incluso mayores.

Uno de los principales factores que contribuyeron a esta alta tasa de mortalidad fue la falta de opciones terapéuticas efectivas para tratar a los pacientes de mayor riesgo<sup>40,275</sup>.

Aunque la vacunación ha protegido a la población general de los cuadros clínicos más severos de COVID-19, ciertos grupos de la población, que no pueden generar una inmunización adecuada debido a su estado de salud o tratamientos, siguen en riesgo de padecer formas graves de la enfermedad. Por ello, es crucial seguir desarrollando y evaluando nuevos tratamientos que puedan prevenir síntomas graves o la muerte en estos grupos vulnerables<sup>30,32,34,37</sup>.

Como resultado, varios grupos de investigación desarrollaron terapias alternativas a aquellas basadas en fármacos clásicos para combatir las infecciones virales. Una de las estrategias más estudiadas ha sido la inmunoterapia, en particular, la inmunoterapia celular adoptiva. Varios estudios han demostrado que una respuesta adecuada de los linfocitos T ejerce un efecto protector contra los cuadros clínicos más graves de la enfermedad y se correlaciona con una mayor tasa de recuperación.<sup>24-26</sup> Se han investigado varias estrategias, como la infusión de linfocitos T específicos para el SARS-CoV-2, debido a la eficacia demostrada por este tipo de terapia en otras infecciones virales, y la infusión de linfocitos Treg para intentar disminuir la inflamación exacerbada asociada con los cuadros clínicos más severos. Además, han surgido propuestas basadas en terapias CAR-T para el tratamiento de enfermedades infecciosas agudas<sup>276,277</sup>.

En nuestros estudios sobre el desarrollo de CAR de segunda generación, hemos observado que el scFv derivado del anticuerpo C10, dirigido contra el dominio de unión al receptor de la proteína S, puede reconocer de forma específica la expresión del antígeno diana en un modelo de infección *in vitro*. Además, en ensayos de citotoxicidad, hemos demostrado que los CAR-T C10-28z y C10-BBz pueden eliminar las células diana y mantener una actividad prolongada. Aunque los CAR-T poseían dominios de coestimulación diferentes, que según la literatura confieren diferentes características en su respuesta<sup>87,88</sup>, no encontramos diferencias significativas en cuanto a citotoxicidad, persistencia o agotamiento de los CAR-T.

Dentro de los grupos de riesgo, los pacientes que han recibido un trasplante de órgano sólido son especialmente vulnerables. Estos pacientes reciben tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo del órgano trasplantado, lo que también compromete su sistema inmunitario frente a infecciones como la COVID-19. Además,

se ha informado que la inmunosupresión puede dificultar la obtención de inmunidad a través de vacunas<sup>278</sup>.

Por ello, exploramos si los linfocitos CAR-T podrían funcionar correctamente en presencia de fármacos inmunosupresores. Nuestros ensayos *in vitro* mostraron que los CAR-T mantienen su actividad citotóxica y podrían eliminar células infectadas incluso bajo los efectos de estos fármacos. La principal diferencia observada fue en la secreción de citocinas proinflamatorias. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los CAR C10-28z y C10-BBz; el C10-28z generó una mayor liberación de citocinas proinflamatorias, lo cual es coherente con la literatura, que sugiere que los CAR con coestimulación CD28 tienen una activación más potente, mientras que los BBz presentan una activación menos intensa pero más persistente<sup>87,88</sup>.

Además, nuestros resultados indican que los corticoides tienen un claro efecto sobre la liberación de citocinas. Aunque ambos tipos de CAR-T mostraron una disminución significativa en la secreción de citocinas, en los CAR C10-BBz este efecto redujo casi por completo la secreción de citocinas proinflamatorias, mientras que los CAR C10-28z mantuvieron niveles considerables de secreción. Creemos que los fármacos inmunosupresores podrían afectar a largo plazo la actividad de los CAR-T, pero estos conservarían su eficacia durante un periodo corto, durante el cual podrían ejercer su efecto terapéutico. Esto se debe a que los inmunosupresores actúan a través de receptores de glucocorticoides que influyen en la expresión génica<sup>279</sup>, por lo que su efecto sobre los CAR-T no sería inmediato. Además, la farmacocinética de fármacos como la prednisona implica fluctuaciones en sus concentraciones sanguíneas, lo que podría prolongar el tiempo de acción terapéutica de los CAR-T antes de que ocurra una inmunosupresión completa<sup>280</sup>.

Finalmente, realizamos ensayos *in vitro* con un modelo de infección real. Los resultados corroboraron los datos de experimentos previos. A pesar de la complejidad metodológica debido al efecto citopático de la infección, los linfocitos CAR-T eliminaron una cantidad significativa de células infectadas por el virus real. Además, se confirmó que la densidad del antígeno, en este caso la proteína S, en la membrana de las células infectadas es suficiente para activar la respuesta mediada por el CAR. Aunque el efecto citotóxico no fue tan evidente como en experimentos anteriores, se observó que una menor, pero clara contribución de los linfocitos CAR-T en la eliminación de células infectadas reduce significativamente la cantidad de partículas infecciosas. Por tanto, no sería necesaria una dosis elevada de linfocitos CAR-T para combatir eficazmente la infección, o cuanto menos evitar las formas graves.

Por último, cabe señalar que todas las aproximaciones en terapia CAR-T contra SARS-CoV-2 se han planteado de forma autóloga<sup>63,64</sup>. Sin embargo, debido a la naturaleza aguda y a la rápida progresión de la enfermedad, la producción de una terapia CAR-T

autóloga, dada la urgencia, podría no ser oportuna para tratar al paciente. Además, se ha reportado linfopenia en diversos individuos con COVID-19 severo<sup>281</sup>, dificultando la obtención de linfocitos T para producir la terapia. Un enfoque alogénico podría hacer que este tipo de terapia sea factible para tratar pacientes que padecen COVID-19<sup>282</sup>.

Por tanto, decidimos combinar la expresión de los CAR C10-28z y C10-BBz con la molécula CD3US6, realizando ensayos *in vitro* para verificar que la función de los CAR no se vea comprometida. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en los parámetros evaluados, como expansión, citotoxicidad o persistencia, entre los CAR convencionales y los alogénicos. Esto nos lleva a concluir que esta aproximación alogénica podría ser una opción terapéutica viable para pacientes con infección por SARS-CoV-2.

Finalmente, es importante destacar que muchos grupos de investigación en este ámbito señalan que la administración de esta terapia podría ser contraproducente. Esto se debe a que, en los estadios más severos de la enfermedad de la COVID-19, se manifiesta clínicamente con una tormenta de citocinas. Así, la administración de una terapia CAR-T, cuyo efecto secundario principal es el síndrome de liberación de citocinas, podría actuar de manera sinérgica con el estado de hiperinflamación del individuo, empeorando su salud<sup>20,21,84,103,104,106</sup>.

Desde nuestro punto de vista, creemos que este tipo de terapia podría ser segura para administrarse en individuos en riesgo si se aplica rápidamente, mientras la enfermedad aún se encuentra en estadios iniciales y no ha alcanzado un estado de hiperinflamación<sup>21</sup>. Además, es importante considerar que la aplicación de esta terapia en el ámbito de las enfermedades infecciosas difiere de su aplicación en enfermedades oncológicas.

Como hemos mencionado anteriormente, la aparición del CRS se correlaciona directamente con algunos factores clave. El primero es la carga tumoral o de enfermedad. En un contexto oncológico, la carga tumoral suele ser considerable debido al tipo de pacientes que llegan a recibir este tratamiento. Sin embargo, en nuestra propuesta, la administración se realizaría en los estadios iniciales de la enfermedad, donde la carga viral o la carga de la enfermedad no sería tan elevada, reduciendo así la posibilidad de generar CRS<sup>21</sup>.

Por otro lado, en las enfermedades oncohematológicas, hay un acondicionamiento previo del paciente que elimina su sistema inmunitario. En el caso de un paciente con COVID-19, creemos que este acondicionamiento no sería necesario, lo que permitiría mantener las poblaciones inmunes naturales, incluidos los linfocitos Treg, que podrían limitar la respuesta mediada por los linfocitos CAR-T frente al virus, y, por tanto, limitar la aparición del CRS<sup>283</sup>.

Además, cabe destacar que las dosis de linfocitos CAR-T administradas en pacientes oncológicos suelen ser bastante elevadas, llevando a la aparición de efectos adversos, por ello, se ha propuesto una administración fraccionada para limitar la aparición de toxicidades no deseadas. En el caso de la COVID-19, creemos que no sería necesaria una dosis tan alta para obtener un beneficio terapéutico, por lo que al reducir las dosis de la terapia también estaríamos limitando la posible aparición de CRS<sup>284</sup>.

Por último, mientras que en las enfermedades oncológicas se requiere una actividad persistente de esta terapia, en una enfermedad infecciosa donde el riesgo de recaída es más bajo, creemos que no sería necesaria una terapia tan persistente<sup>285</sup>. Por ello, consideramos que, en este caso concreto, podría combinarse la administración de la terapia CAR-T con fármacos inmunosupresores. Por un lado, estos glucocorticoides ayudarían a reducir la cantidad de citocinas liberadas, protegiendo contra un posible CRS, mientras permitirían a los linfocitos CAR-T mediar su función durante un período corto, pero suficiente, para disminuir la carga viral. Además, algunos estudios han señalado que el uso de inmunosupresores de amplio espectro se asocia con una mejor prognosis en pacientes con cuadros clínicos más severos<sup>284</sup>.

A pesar de todo ello, somos conscientes de que el uso de esta terapia podría suponer un riesgo para los pacientes tratados. Por ello, creemos que las futuras líneas de investigación podrían centrarse en desarrollar linfocitos CAR-T modificados para expresar un gen suicida, de manera que se pudiera detener su actividad si esta se descontrolara y causara daño al paciente<sup>115</sup>. Otra estrategia que considerar es la administración de linfocitos CAR-T generados a través de tecnología de mRNA. Como se ha descrito, la administración de mRNA exógeno en las células genera una expresión transitoria de las proteínas, cuyo tiempo de expresión varía según las características de cada proteína. Así, podríamos generar una expresión transitoria del CAR, asegurando que su actividad no se prolongue demasiado en el tiempo, limitando así el posible daño a los tejidos o un CRS debido a la sobreestimulación de los linfocitos T a través de la señalización del CAR<sup>286</sup>.

Durante el transcurso de esta tesis doctoral, hemos desarrollado un nuevo motivo de retención para generar intracuerpos. A partir de estudios previos, hemos mejorado la tecnología existente al dar un nuevo enfoque a las propiedades de las inmunoquinas. De esta manera, hemos implementado una estrategia que no requiere de edición génica para impedir la expresión de moléculas de interés, especialmente las moléculas CD3 y HLA-I, las cuales desempeñan un papel crucial en la respuesta alogénica y en la generación de terapias CAR-T a partir de donantes alogénicos. Además, hemos comprobado que la expresión de CD3US6 con un CAR de segunda generación genera linfocitos CAR-T funcionales, sin que se aprecien diferencias significativas respecto a los linfocitos CAR convencionales.

También cabe destacar que, durante la investigación, hemos desarrollado nuevos CAR-T dirigidos contra la proteína S, siendo uno de los primeros estudios en este campo que se centra en enfermedades infecciosas de naturaleza aguda. Aunque esta terapia dirigida contra el SARS-CoV-2 no pueda ser utilizada actualmente debido a que la pandemia ha finalizado y el número de casos severos es muy reducido, creemos que estos estudios pueden sentar un precedente. De hecho, numerosos estudios de modelización basados en la evolución del cambio climático predicen un incremento en la cantidad de nuevos saltos de especie de virus, incluidos los que afectan a los seres humanos. Por tanto, no es descartable que en el futuro haya una mayor frecuencia de epidemias causadas por agentes infecciosos, en las que esta tecnología CAR-T pueda ser probada como opción terapéutica<sup>287</sup>.

En todo caso, una vez demostramos eficacia y seguridad de estas aproximaciones estamos iniciando un sinfín de propuestas (construcciones diversas, células diversas, complementos,...) donde los límites se definen por el conocimiento fisiopatológico y la imaginación del investigador.

# **Conclusiones**



1. La inmunoevasina viral US6 del citomegalovirus humano puede ser utilizada como motivo de retención para generar intracuerpos en el RE.
2. La combinación de US6 junto a un scFv contra CD3 $\epsilon$ , CD3US6, permite generar una doble retención de las moléculas de HLA-I y CD3 en linfocitos T.
3. La reducción parcial de CD3 y HLA-I es suficiente para disminuir eventos de GvHD y rechazo en un contexto de trasplante alogénico.
4. La expresión de CD3US6 es compatible con un CAR de segunda generación, y no altera la funcionalidad de los linfocitos CAR-T, permitiendo la generación de linfocitos CAR-T para su uso alogénico.
5. La expresión de un CAR de segunda generación, dirigido contra la proteína S del SARS-CoV-2, en linfocitos T permite a estos reconocer y eliminar específicamente células infectadas.
6. Los CAR-T contra la proteína S con un dominio de coestimulación basado en el dominio 4-1BB presenta una menor liberación de citocinas.
7. La presencia de fármacos inmunosupresores no afecta la citotoxicidad de los linfocitos CAR-T C10-28z y C10-BBz *in vitro*, pero reduce la cantidad de citocinas liberadas.
8. La expresión de CD3US6 no afecta a la función de los CAR-T C10-28z y C10-BBz *in vitro*.



# **Bibliografía**



1. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J. *Kuby Immunology*. 7th ed.; 2013.
2. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651-668. doi:10.1038/s41577-020-0306-5
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/nejmoa2001017
4. [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjwsuvjBhAXEiwA](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjwsuvjBhAXEiwA).
5. Bonotti M, Zech ST. The Human, Economic, Social, and Political Costs of COVID-19. In: *Recovering Civility during COVID-19*. Springer Singapore; 2021:1-36. doi:10.1007/978-981-33-6706-7\_1
6. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*. 2020;24:91-98. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005
7. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
8. Yogo Y, Hirano N, Hino S, Shibuta H, Matumoto M. Polyadenylate in the virion RNA of mouse hepatitis virus. *J Biochem*. 1977;82(4):1103-8. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131782
9. Lai MM, Stohlman SA. Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses. *J Virol*. 1981;38(2):661-70. doi:10.1128/JVI.38.2.661-670.1981
10. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020;181(4):914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011
11. Zúñiga S, Sola I, Alonso S, Enjuanes L. Sequence Motifs Involved in the Regulation of Discontinuous Coronavirus Subgenomic RNA Synthesis. *J Virol*. 2004;78(2):980-994. doi:10.1128/jvi.78.2.980-994.2004

12. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol.* 2015;2:265-288. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218
13. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology.* 2004;203(2):631-637. doi:10.1002/path.1570
14. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3-20. doi:10.1038/s41580-021-00418-x
15. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39. doi:10.1038/s41580-021-00432-z
16. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
17. Klein S, Cortese M, Winter SL, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-19619-7
18. de Haan CAM, Rottier PJM. Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2005;64:165-230. doi:10.1016/S0065-3527(05)64006-7
19. Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, et al.  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell.* 2020;183(6):1520-1535.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.10.039
20. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8
21. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2020;39(5):405-407. doi:10.1016/j.healun.2020.03.012
22. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(10):1135-1140. doi:10.1016/S1473-3099(20)30434-5

23. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(9):2103-2109. doi:10.1111/jth.14975
24. Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):842-844. doi:10.1038/s41591-020-0901-9
25. Melms JC, Biermann J, Huang H, et al. A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. *Nature*. 2021;595(7865):114-119. doi:10.1038/s41586-021-03569-1
26. Bange EM, Han NA, Wileyto P, et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med*. 2021;27(7):1280-1289. doi:10.1038/s41591-021-01386-7
27. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(5):403-416. doi:10.1056/nejmoa2035389
28. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(27):2603-2615. doi:10.1056/nejmoa2034577
29. Herrera S, Colmenero J, Pascal M, et al. Cellular and humoral immune response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in liver and heart transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2021;21(12):3971-3979. doi:10.1111/ajt.16768
30. Cucchiari D, Egri N, Bodro M, et al. Cellular and humoral response after MRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2021;21(8):2727-2739. doi:10.1111/ajt.16701
31. Schmidt T, Klemis V, Schub D, et al. Cellular immunity predominates over humoral immunity after homologous and heterologous mRNA and vector-based COVID-19 vaccine regimens in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2021;21(12):3990-4002. doi:10.1111/ajt.16818
32. Hall VG, Ferreira VH, Ierullo M, et al. Humoral and cellular immune response and safety of two-dose SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2021;21(12):3980-3989. doi:10.1111/ajt.16766
33. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Immunogenicity of a Single Dose of SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA*. 2021;325(17):1784. doi:10.1001/jama.2021.4385

34. Nogimori T, Nagatsuka Y, Kobayashi S, et al. Humoral and cellular immune responses to COVID-19 mRNA vaccines in immunosuppressed liver transplant recipients. *Communications Medicine*. 2024;4(1). doi:10.1038/s43856-024-00448-4
35. Greenberger LM, Saltzman LA, Senefeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell*. 2021;39(8):1031-1033. doi:10.1016/j.ccell.2021.07.012
36. Jimenez M, Roldan E, Fernandez-Naval C, et al. Cellular and humoral immunogenicity of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Adv*. 2022;6(3):774-784. doi:10.1182/bloodadvances.2021006101
37. Roeker LE, Knorr DA, Thompson MC, et al. COVID-19 vaccine efficacy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2021;35(9):2703-2705. doi:10.1038/s41375-021-01270-w
38. Monin L, Laing AG, Muñoz-Ruiz M, et al. Safety and immunogenicity of one versus two doses of the COVID-19 vaccine BNT162b2 for patients with cancer: interim analysis of a prospective observational study. *Lancet Oncol*. 2021;22(6):765-778. doi:10.1016/S1470-2045(21)00213-8
39. Egri N, Calderón H, Martínez R, et al. Cellular and humoral responses after second and third SARS-CoV-2 vaccinations in patients with autoimmune diseases treated with rituximab: specific T cell immunity remains longer and plays a protective role against SARS-CoV-2 reinfections. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1146841
40. Martínez MA. Lack of Effectiveness of Repurposed Drugs for COVID-19 Treatment. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.635371
41. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(19):1813-1826. doi:10.1056/nejmoa2007764
42. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(4):305-315. doi:10.1056/nejmoa2116846
43. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(15):1397-1408. doi:10.1056/nejmoa2118542

44. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(6):509-520. doi:10.1056/nejmoa2116044
45. Sterne JAC, Murthy S, Diaz J V., et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA*. 2020;324(13):1330. doi:10.1001/jama.2020.17023
46. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(8):693-704. doi:10.1056/NEJMoa2021436
47. Florescu S, Stanciu D, Zaharia M, et al. Long-term (180-Day) Outcomes in Critically Ill Patients With COVID-19 in the REMAP-CAP Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2023;329(1):39. doi:10.1001/jama.2022.23257
48. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(16):1491-1502. doi:10.1056/NEJMoa2100433
49. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2021;397(10285):1637-1645. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00676-0.
50. Guimarães PO, Quirk D, Furtado RH, et al. Tofacitinib in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(5):406-415. doi:10.1056/nejmoa2101643
51. RECOVERY Collaborative Group. Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis. *Lancet*. 2022;400(10349):359-368. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01109-6.
52. Li L, Zhang W, Hu Y, et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19. *JAMA*. 2020;324(5):460. doi:10.1001/jama.2020.10044
53. Perotti C, Baldanti F, Bruno R, et al. Mortality reduction in 46 patients with severe COVID-19 treated with hyperimmune plasma. A proof-of-concept, single-arm, multicenter trial. *Haematologica*. 2020;105(12):2834-2840. doi:10.3324/haematol.2020.261784

54. Duan K, Liu B, Li C, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Apr 28;117(17):9490-9496. doi: 10.1073/pnas.2004168117.
55. Somersan-Karakaya S, Mylonakis E, Menon VP, et al. Casirivimab and Imdevimab for the Treatment of Hospitalized Patients with COVID-19. *J Infect Dis*. 2022;227(1):23-34. doi: 10.1093/infdis/jiac320.
56. Kim JY, Săndulescu O, Preotescu LL, et al. A Randomized Clinical Trial of Regdanvimab in High-Risk Patients With Mild-to-Moderate Coronavirus Disease 2019. *Open Forum Infect Dis*. 2022;9(8). doi:10.1093/ofid/ofac406
57. Lee J, Park SS, Kim TY, Lee DG, Kim DW. Lymphopenia as a biological predictor of outcomes in COVID-19 patients: A nationwide cohort study. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):1-15. doi:10.3390/cancers13030471
58. Papadopoulou A, Karavalakis G, Papadopoulou E, et al. SARS-CoV-2-specific T cell therapy for severe COVID-19: a randomized phase 1/2 trial. *Nat Med*. 2023;29(8):2019-2029. doi:10.1038/s41591-023-02480-8
59. Kim N, Lee JM, Oh EJ, et al. Off-the-Shelf Partial HLA Matching SARS-CoV-2 Antigen Specific T Cell Therapy: A New Possibility for COVID-19 Treatment. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.751869
60. Ahmed F, Jo DH, Lee SH. Can Natural Killer Cells Be a Principal Player in Anti-SARS-CoV-2 Immunity? *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.586765
61. Gladstone DE, D'Alessio F, Howard C, et al. Randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of allogeneic cord blood T-regulatory cells for treatment of COVID-19 ARDS. *Blood Adv*. 2023;7(13):3075-3079. doi:10.1182/bloodadvances.2022009619
62. Gladstone DE, Kim BS, Mooney K, Karaba AH, D'Alessio FR. Regulatory T Cells for Treating Patients With COVID-19 and Acute Respiratory Distress Syndrome: Two Case Reports. *Ann Intern Med*. 2020;173(10):852-853. doi:10.7326/L20-0681
63. Gonzalez-Garcia P, Muñoz-Miranda JP, Fernandez-Cisnal R, et al. Specific Activation of T Cells by an ACE2-Based CAR-Like Receptor upon Recognition of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8):7641. doi:10.3390/ijms24087641

64. Guo X, Kazanova A, Thurmond S, Saragovi HU, Rudd CE. Effective chimeric antigen receptor T cells against SARS-CoV-2. *iScience*. 2021;24(11):103295. doi:10.1016/j.isci.2021.103295
65. Lu T, Ma R, Dong W, et al. Off-the-shelf CAR natural killer cells secreting IL-15 target spike in treating COVID-19. *Nat Commun*. 2022;13(1). doi:10.1038/s41467-022-30216-8
66. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;149(3):960-8. doi: 10.1016/0006-291x(87)90502-x.
67. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):10024-8. doi: 10.1073/pnas.86.24.10024.
68. 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 U S A*. 1993;90(2):720-4. doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
69. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388-398. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0548
70. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus MV. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;12:145-156. doi:10.1016/j.omtm.2018.12.009
71. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(26):2531-2544. doi:10.1056/nejmoa1707447
72. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(8):725-733. doi:10.1056/nejmoa1103849
73. Sauer T, Parikh K, Sharma S, et al. CD70-Specific CAR T Cells Have Potent Activity against Acute Myeloid Leukemia without HSC Toxicity. *Blood*. 2021;138(4):318-330. doi: 10.1182/blood.2020008221.

74. Brown CE, Starr R, Aguilar B, et al. Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL13R $\alpha$ 2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13-zetakine-redirected T cells. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(8):2199-2209. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1669
75. Burns WR, Zhao Y, Frankel TL, et al. A high molecular weight melanoma-associated antigen - Specific chimeric antigen receptor redirects lymphocytes to target human melanomas. *Cancer Res*. 2010;70(8):3027-3033. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2824
76. Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(12):3153-3164. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0330
77. Desplancq D, King DJ, Lawson AD, Mountain A. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Eng*. 1994;7(8):1027-33. doi: 10.1093/protein/7.8.1027.
78. Ajina A, Maher J. Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(9):1795-1815. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-1097
79. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*. 2020;58. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102931
80. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, et al. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane. *J Immunol*. 2008;180(10):7028-38. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.7028.
81. Courtney AH, Lo WL, Weiss A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(2):108-123. doi:10.1016/j.tibs.2017.11.008
82. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-Lymphocyte Cytotoxicity and Proliferation Directed by a Single Chimeric TCR $\zeta$  /CD28 Receptor. *Nat Biotechnol*. 2002;20(1):70-5. doi: 10.1038/nbt0102-70.
83. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. Brief report CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*. 2011;121. doi:10.1172/JCI46110DS1
84. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(16):1507-1517. doi:10.1056/nejmoa1407222

85. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(26):2545-2554. doi:10.1056/nejmoa1708566
86. Weinkove R, George P, Dasyam N, McLellan AD. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clin Transl Immunology*. 2019;8(5). doi:10.1002/cti2.1049
87. Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal*. 2018;11(544). doi:10.1126/scisignal.aat6753
88. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*. 2016;44(2):380-390. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.021
89. Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011;118(18):4817-4828. doi:10.1182/blood-2011-04-348540
90. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 2018;24(5):563-571. doi:10.1038/s41591-018-0010-1
91. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer*. 2019;120(1):26-37. doi:10.1038/s41416-018-0325-1
92. Hwu P, Yang JC, Cowherd R, et al. In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res*. 1995;55(15):3369-3373.
93. Hwu P, Sharer GE, Treisman J, et al. Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor gamma chain. *J Exp Med*. 1993 Jul 1;178(1):361-6. doi:10.1084/jem.178.1.361.
94. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(20 PART 1):6106-6115. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1183

95. Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI 3 kinase/AKT/Bcl-X L activation and CD8 T cell-mediated tumor eradication. *Molecular Therapy*. 2010;18(2):413-420. doi:10.1038/mt.2009.210
96. Guedan S, Posey AD, Shaw C, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight*. 2018;3(1). doi:10.1172/jci.insight.96976
97. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3360-5. doi:10.1073/pnas.0813101106.
98. Yeku OO, Brentjens RJ. Armored CAR T-cells: Utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(2):412-418. doi:10.1042/BST20150291
99. Suarez ER, Chang DK, Sun J, et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget*. 2016;7(23):34341-34355. doi:10.18632/oncotarget.9114
100. Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*. 2018;24(3):352-359. doi:10.1038/nm.4478
101. Samur MK, Fulciniti M, Aktas Samur A, et al. Biallelic loss of BCMA as a resistance mechanism to CAR T cell therapy in a patient with multiple myeloma. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-21177-5
102. Majzner RG, Mackall CL. Tumor antigen escape from car t-cell therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(10):1219-1226. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0442
103. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16011. doi:10.1038/mto.2016.11
104. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, 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):664-679. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0040

105. Hay KA, Hanafi LA, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood*. 2017;130(21):2295-2306. doi: 10.1182/blood-2017-06-793141.
106. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(224). doi:10.1126/scitranslmed.3008226
107. Siegler EL, Kenderian SS. Neurotoxicity and Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Insights Into Mechanisms and Novel Therapies. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01973
108. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019;25(4):625-638. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.758
109. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: Current understanding and future directions. *Journal of Gene Medicine*. 2012;14(6):405-415. doi:10.1002/jgm.2604
110. Hill JA, Giralt S, Torgerson TR, Lazarus HM. CAR-T – and a side order of IgG, to go? – Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy. *Blood Rev*. 2019;38. doi:10.1016/j.blre.2019.100596
111. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*. 2010;18(4):843-851. doi:10.1038/mt.2010.24
112. Bailey SR, Berger TR, Graham C, Larson RC, Maus M V. Four challenges to CAR T cells breaking the glass ceiling. *Eur J Immunol*. 2023;53(11). doi:10.1002/eji.202250039
113. Han X, Wang Y, Wei J, Han W. Multi-antigen-targeted chimeric antigen receptor T cells for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1). doi:10.1186/s13045-019-0813-7
114. Juillerat A, Tkach D, Busser BW, et al. Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch. *BMC Biotechnol*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12896-019-0537-3
115. Amatya C, Pegues MA, Lam N, et al. Development of CAR T Cells Expressing a Suicide Gene Plus a Chimeric Antigen Receptor Targeting Signaling

- Lymphocytic-Activation Molecule F7. *Molecular Therapy*. 2021;29(2):702-717. doi:10.1016/j.ymthe.2020.10.008
116. Marofi F, Motavalli R, Safonov VA, et al. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1). doi:10.1186/s13287-020-02128-1
117. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, et al. *Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity*. *Sci Transl Med*. 2014;6(261):261ra151. doi:10.1126/scitranslmed.3010162.
118. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(26):2561-2569. doi:10.1056/nejmoa1610497
119. Liu G, Rui W, Zheng H, et al. CXCR2-modified CAR-T cells have enhanced trafficking ability that improves treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur J Immunol*. 2020;50(5):712-724. doi:10.1002/eji.201948457
120. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes. *Nat Med*. 2015;21(5):524-529. doi:10.1038/nm.3833
121. Adusumilli PS, Zauderer MG, Rivière I, et al. A phase I trial of regional mesothelin-targeted CAR T-cell therapy in patients with malignant pleural disease, in combination with the anti-PD-1 agent pembrolizumab. *Cancer Discov*. 2021;11(11):2748-2763. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0407
122. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-00462-8
123. Guzman G, Reed MR, Bielamowicz K, Koss B, Rodriguez A. CAR-T Therapies in Solid Tumors: Opportunities and Challenges. *Curr Oncol Rep*. 2023;25(5):479-489. doi:10.1007/s11912-023-01380-x
124. Bailey SR, Berger TR, Graham C, Larson RC, Maus MV. Four challenges to CAR T cells breaking the glass ceiling. *Eur J Immunol*. 2023;53(11). doi:10.1002/eji.202250039
125. Gajra A, Zalenski A, Sannareddy A, Jeune-Smith Y, Kapinos K, Kansagra A. Barriers to Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapies in Clinical

- Practice. *Pharmaceut Med.* 2022;36(3):163-171. doi:10.1007/s40290-022-00428-w
126. Scheffer Cliff ER, Kelkar AH, Russler-Germain DA, et al. High Cost of Chimeric Antigen Receptor T-Cells: Challenges and Solutions. Published online 2024. doi:10.1200/EDBK\_
127. Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, et al. Point-of-care CAR T-cell production (ARI-0001) using a closed semi-automatic bioreactor: Experience from an academic phase i clinical trial. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00482
128. Delgado J, Roddie C, Schmitt M. Point-of-Care Production of CAR-T Cells. 2022. The EBMT/EHA CAR-T Cell Handbook [Internet]. Cham (CH): Springer; 2022. Chapter 8.
129. Mailankody S, Matous J V., Chhabra S, et al. Allogeneic BCMA-targeting CAR T cells in relapsed/refractory multiple myeloma: phase 1 UNIVERSAL trial interim results. *Nat Med.* 2023;29(2):422-429. doi:10.1038/s41591-022-02182-7
130. Roddie C, O'Reilly M, Dias Alves Pinto J, Vispute K, Lowdell M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy.* 2019;21(3):327-340. doi:10.1016/j.jcyt.2018.11.009
131. Caldwell KJ, Gottschalk S, Talleur AC. Allogeneic CAR Cell Therapy—More Than a Pipe Dream. *Front Immunol.* 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.618427
132. Das RK, O'Connor RS, Grupp SA, Barrett DM. Lingering effects of chemotherapy on mature T cells impair proliferation. *Blood Adv.* 2020;4(19):4653-4664. doi:10.1182/bloodadvances.2020001797
133. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(4):547-562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012
134. Hoffmann JM, Schubert ML, Wang L, et al. Differences in expansion potential of naive chimeric antigen receptor T cells from healthy donors and untreated chronic lymphocytic leukemia patients. *Front Immunol.* 2018;8(JAN). doi:10.3389/fimmu.2017.01956
135. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2018;378(5):439-448. doi:10.1056/nejmoa1709866

136. Abou-El-Enein M, Elsallab M, Feldman SA, et al. Scalable Manufacturing of CAR T Cells for Cancer Immunotherapy. *Blood Cancer Discov.* 2021;2(5):408-422. doi:10.1158/2643-3230.BCD-21-0084
137. Martin KE, Hammer Q, Perica K, Sadelain M, Malmberg KJ. Engineering immune-evasive allogeneic cellular immunotherapies. *Nat Rev Immunol.* Published online 2024. doi:10.1038/s41577-024-01022-8
138. Hildemann WH. Some new concepts in immunological phylogeny. *Nature.* 1974;250(5462):116-120. doi:10.1038/250116a0
139. BURNET FM. "Self-recognition" in Colonial Marine Forms and Flowering Plants in relation to the Evolution of Immunity. *Nature.* 1971;232(5308):230-235. doi:10.1038/232230a0
140. Goulmy E. Minor Histocompatibility Antigens: from Transplantation Problems to Therapy of Cancer. *Hum Immunol.* 2006;67(6):433-438. doi:10.1016/j.humimm.2006.03.012
141. Dierselhuis M, Goulmy E. The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009;14(4):419-425. doi:10.1097/MOT.0b013e32832d399c
142. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J.* 2007;48(1):11. doi:10.3349/ymj.2007.48.1.11
143. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: Organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(16):1172-1187. doi:10.1093/jnci/djt184
144. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(4):203-216. doi:10.1038/nri3818
145. Lakkis FG, Lechler RI. Origin and biology of the allogeneic response. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(8). doi:10.1101/cshperspect.a014993
146. Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(12):942-953. doi:10.1038/nri2200
147. Steinmuller D. Passenger leukocytes and the immunogenicity of skin allografts. *Journal of Investigative Dermatology.* 1980;75(1):107-115. doi:10.1111/1523-1747.ep12521331

148. Billingham RE. The passenger cell concept in transplantation immunology. *Cell Immunol.* 1971;2(1):1-12. doi: 10.1016/0008-8749(71)90022-0.
149. Golding H, Singer A. Role of accessory cell processing and presentation of shed H-2 alloantigens in allospecific cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of Immunology.* 1984;133(2):597-605. doi:10.4049/jimmunol.133.2.597
150. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 1982;155(1):31-41. doi: 10.1084/jem.155.1.31.
151. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173(8):4828-37. doi: 10.4049/jimmunol.173.8.4828.
152. Markey KA, Koyama M, Gartlan KH, et al. Cross-Dressing by Donor Dendritic Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation Contributes to Formation of the Immunological Synapse and Maximizes Responses to Indirectly Presented Antigen. *The Journal of Immunology.* 2014;192(11):5426-5433. doi:10.4049/jimmunol.1302490
153. Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM. Pathogenesis and Management of Graft-versus-Host Disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30(1):75-101. doi:10.1016/j.iac.2009.10.001
154. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res.* 2007;150(4):197-214. doi: 10.1016/j.trsl.2007.06.003.
155. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood.* 1994 Apr 15;83(8):2360-7.
156. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood.* 1997;90(8):3204-13.
157. Choi SW, Kitko CL, Braun T, et al. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. *Blood.* 2008;112(4):1539-1542. doi:10.1182/blood-2008-02-138867

158. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2754-9.
159. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5. doi: 10.1126/science.1071059.
160. Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*. 2005;106(3):1113-1122. doi:10.1182/blood-2005-02-0509
161. Korngold R, Sprent J. Negative selection of T cells causing lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. Role of the H-2 complex. *J Exp Med*. 1980;151(5):1114-24. doi: 10.1084/jem.151.5.1114
162. Wysocki CA, Panoskaltzis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;105(11):4191-9. doi: 10.1182/blood-2004-12-4726.
163. Van den Brink MRM, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):273-281. doi:10.1038/nri775
164. Hill GR, Koyama M. Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2020 Jul 23;136(4):418-428. doi: 10.1182/blood.2019000952.
165. Antin JH, Ferrara JLM. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1992;80(12):2964-2968. doi:10.1182/blood.v80.12.2964.bloodjournal80122964
166. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute graft-versus-host disease. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer International Publishing; 2018:323-330. doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_43
167. Benjamin R, Graham C, Yallop D, et al. *Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies*. *Lancet*. 2020;396(10266):1885-1894. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32334-5.
168. Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(6):545-553. doi:10.1056/nejmoa1910607

169. Rezvani K, Rouse RH. The application of natural killer cell immunotherapy for the treatment of cancer. *Front Immunol.* 2015;6(NOV). doi:10.3389/fimmu.2015.00578
170. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, et al. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02873
171. Nguyen R, Wu H, Pounds S, et al. A phase II clinical trial of adoptive transfer of haploidentical natural killer cells for consolidation therapy of pediatric acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1). doi:10.1186/s40425-019-0564-6
172. Du Z, Ng YY, Zha S, Wang S. piggyBac system to co-express NKG2D CAR and IL-15 to augment the in vivo persistence and anti-AML activity of human peripheral blood NK cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021;23:582-596. doi:10.1016/j.omtm.2021.10.014
173. Zhai X, You F, Xiang S, et al. *MUC1-Tn-targeting chimeric antigen receptor-modified V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells with enhanced antigen-specific anti-tumor activity.* *Am J Cancer Res.* 2021 Jan 1;11(1):79-91.
174. Hayday AC.  $\gamma\delta$  T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. *Immunity.* 2009;31(2):184-196. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.006
175. Lo Presti E, Dieli F, Meraviglia S. Tumor-infiltrating  $\gamma\delta$  T lymphocytes: Pathogenic role, clinical significance, and differential programming in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2014;5(NOV). doi:10.3389/fimmu.2014.00607
176. Comeau K, Paradis P, Schiffrin EL. Human and murine memory  $\gamma\delta$  T cells: Evidence for acquired immune memory in bacterial and viral infections and autoimmunity. *Cell Immunol.* 2020;357. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104217
177. Nishimoto KP, Barca T, Azameera A, et al. Allogeneic CD20-targeted  $\gamma\delta$  T cells exhibit innate and adaptive antitumor activities in preclinical B-cell lymphoma models. *Clin Transl Immunology.* 2022;11(2). doi:10.1002/cti2.1373
178. Lamb LS, Musk P, Ye Z, et al. *Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response.* *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(6):601-6. doi: 10.1038/sj.bmt.1702830.

179. Burnham RE, Zoine JT, Story JY, et al. Characterization of Donor Variability for  $\gamma\delta$  T Cell ex vivo Expansion and Development of an Allogeneic  $\gamma\delta$  T Cell Immunotherapy. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7. doi:10.3389/fmed.2020.588453
180. Song Y, Liu Y, Teo HY, Liu H. Targeting Cytokine Signals to Enhance  $\gamma\delta$ T Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.914839
181. Joseph Melenhorst J, Leen AM, Bollard CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood*. 2010;116. doi:10.1182/blood-2010-06
182. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35:3547-3557. doi:10.1200/JCO
183. Russell Cruz CY, Micklethwaite KP, Savoldo B, et al. Infusion of donor-derived CD19-redirected virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood*. 2013;122(17):2965-73. doi: 10.1182/blood-2013-06-506741.
184. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: Persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*. 2008;14(11):1264-1270. doi:10.1038/nm.1882
185. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, Koehne G, Doubrovina E. Virus-specific T-cell banks for "off the shelf" adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(9):1163-1172. doi:10.1038/bmt.2016.17
186. Fernández L, Fernández A, Mirones I, et al. GMP-Compliant Manufacturing of NKG2D CAR Memory T Cells Using CliniMACS Prodigy. *Front Immunol*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02361
187. Anderson BE, McNiff J, Yan J, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(1):101-108. doi:10.1172/JCI17601
188. Chen BJ, Deoliveira D, Cui X, et al. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. 2007;109:3115-3123. doi:10.1182/blood

189. Chan WK, Suwannasaen D, Throm RE, et al. Chimeric antigen receptor-redirected CD45RA-negative T cells have potent antileukemia and pathogen memory response without graft-versus-host activity. *Leukemia*. 2015;29(2):387-395. doi:10.1038/leu.2014.174
190. Wang X, Naranjo A, Brown CE, et al. *Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8+ central memory T cells manufactured at clinical scale*. *J Immunother*. 2012;35(9):689-701. doi:10.1097/CJI.0b013e318270dec7.
191. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(1):294-305. doi:10.1172/JCI32103
192. Nianias A, Themeli M. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Lymphocytes for Adoptive Cell Immunotherapy: Recent Advances and Challenges. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(4):261-268. doi:10.1007/s11899-019-00528-6
193. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, et al. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):114-126. doi:10.1016/j.stem.2012.11.002
194. Iriguchi S, Yasui Y, Kawai Y, et al. A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-020-20658-3
195. Wang Z, McWilliams-Koeppen HP, Reza H, et al. 3D-organoid culture supports differentiation of human CAR+ iPSCs into highly functional CAR T cells. *Cell Stem Cell*. 2022;29(4):515-527.e8. doi:10.1016/j.stem.2022.02.009
196. van der Stegen SJC, Lindenbergh PL, Petrovic RM, et al. Generation of T-cell-receptor-negative CD8 $\alpha\beta$ -positive CAR T cells from T-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng*. 2022;6(11):1284-1297. doi:10.1038/s41551-022-00915-0
197. Netsrithong R, Garcia-Perez L, Themeli M. Engineered T cells from induced pluripotent stem cells: from research towards clinical implementation. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1325209
198. Moradi S, Mahdizadeh H, Šarić T, et al. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): Social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1455-y

199. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(3):185-199. doi:10.1038/s41573-019-0051-2
200. Aftab BT, Sasu B, Krishnamurthy J, Gschweng E, Alcazer V, Depil S. Toward "off-the-shelf" allogeneic CAR T cells. *Adv Cell Gene Ther.* 2020;3(3). doi:10.1002/acg2.86
201. Holm A, Løvendorf MB, Kauppinen S. Development of siRNA Therapeutics for the Treatment of Liver Diseases. *Methods Mol Biol.* 2021;2282:57-75. doi:10.1007/978-1-0716-1298-9\_5.
202. Setten RL, Rossi JJ, Han S ping. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(6):421-446. doi:10.1038/s41573-019-0017-4
203. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003;21(6):635-637. doi:10.1038/nbt831
204. Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods.* 2006;3(3):199-204. doi:10.1038/nmeth854
205. Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY. microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2021;12(3). doi:10.1002/wrna.1627
206. Boudreau RL, Monteys AM, Davidson BL. Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *RNA.* 2008;14(9):1834-1844. doi:10.1261/rna.1062908
207. ter Brake O, 't Hooft K, Liu YP, Centlivre M, von Eije KJ, Berkhout B. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Molecular Therapy.* 2008;16(3):557-564. doi:10.1038/sj.mt.6300382
208. Rossi M, Steklov M, Huberty F, et al. Efficient shRNA-based knockdown of multiple target genes for cell therapy using a chimeric miRNA cluster platform. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2023;34. doi:10.1016/j.omtn.2023.102038
209. Al-Homsi AS, Anguille S, Deeren D, et al. Immunicy-1: Targeting BCMA with Cyad-211 to Establish Proof of Concept of an shRNA-Based Allogeneic CAR T Cell Therapy Platform. *Blood.* 2021;138(Supplement 1):2817-2817. doi:10.1182/blood-2021-147738

210. Certo MT, Morgan RA. Salient Features of Endonuclease Platforms for Therapeutic Genome Editing. *Molecular Therapy*. 2016;24(3):422-429. doi:10.1038/mt.2016.21
211. Gaj T, Sirk SJ, Shui S lan, Liu J. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(12):a023754. doi:10.1101/cshperspect.a023754
212. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(27):10524-10535. doi:10.1074/jbc.TM118.000372
213. Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. 2013;2(3):130-143. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02
214. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2002;161(3):1169-75. doi: 10.1093/genetics/161.3.1169.
215. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*. 2005;435(7042):646-651. doi:10.1038/nature03556
216. Auer TO, Duroure K, De Cian A, Concordet JP, Del Bene F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*. 2014;24(1):142-153. doi:10.1101/gr.161638.113
217. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000;29:183-212. doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.183.
218. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011;188(4):773-782. doi:10.1534/genetics.111.131433
219. Vanamee ÉS, Santagata S, Aggarwal AK. FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J Mol Biol*. 2001;309(1):69-78. doi:10.1006/jmbi.2001.4635
220. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*. 2010;48:419-436. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081936
221. Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (1979)*. 2009;326(5959):1509-1512. doi:10.1126/science.1178811

222. Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):9283-9293. doi:10.1093/nar/gkr597
223. Stoddard BL. Homing endonucleases from mobile group I introns: Discovery to genome engineering. *Mob DNA.* 2014;5(1). doi:10.1186/1759-8753-5-7
224. Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, et al. MegaTALs: A rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(4):2591-2601. doi:10.1093/nar/gkt1224
225. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (1979).* 2007;315(5819):1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
226. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
227. Koo T, Lee J, Kim JS. Measuring and reducing off-target activities of programmable nucleases including CRISPR-Cas9. *Mol Cells.* 2015;38(6):475-481. doi:10.14348/molcells.2015.0103
228. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges. *Nat Med.* 2015;21(2):121-131. doi:10.1038/nm.3793
229. Lee EYHP, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10). doi:10.1101/cshperspect.a003236
230. Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, et al. P53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med.* 2018;24(7):939-946. doi:10.1038/s41591-018-0050-6
231. Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guhl E, et al. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Molecular Therapy.* 2008;16(2):352-358. doi:10.1038/sj.mt.6300357
232. Mussolino C, Alzubi J, Fine EJ, et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(10):6762-6773. doi:10.1093/nar/gku305
233. Foss DV, Norris AL. Genome editing technologies. In: *Rigor and Reproducibility in Genetics and Genomics*. Elsevier; 2023:397-423. doi:10.1016/B978-0-12-817218-6.00011-5

234. Li A, Tanner MR, Lee CM, et al. AAV-CRISPR Gene Editing Is Negated by Pre-existing Immunity to Cas9. *Molecular Therapy*. 2020;28(6):1432-1441. doi:10.1016/j.ymthe.2020.04.017
235. Vandamme C, Adjali O, Mingozzi F. Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Hum Gene Ther*. 2017;28(11):1061-1074. doi:10.1089/hum.2017.150
236. Atsavapranees ES, Billingsley MM, Mitchell MJ. Delivery technologies for T cell gene editing: Applications in cancer immunotherapy. *EBioMedicine*. 2021;67. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103354
237. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*. 2018;36(8):765-771. doi:10.1038/nbt.4192
238. Lee H, Kim JS. Unexpected CRISPR on-target effects. *Nat Biotechnol*. 2018;36(8). doi:10.1038/nbt.4207
239. Ewaisha R, Anderson KS. Immunogenicity of CRISPR therapeutics—Critical considerations for clinical translation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11. doi:10.3389/fbioe.2023.1138596
240. Shen B, Zhang W, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*. 2014;11(4):399-402. doi:10.1038/nmeth.2857
241. Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(16):7889-93. doi:10.1073/pnas.90.16.7889.
242. Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO J*. 1990;9(1):101-108. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08085.x
243. Marschall ALJ, Dübel S, Böldicke T. Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies. *MAbs*. 2015;7(6):1010-1035. doi:10.1080/19420862.2015.1076601
244. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 1987 Mar 13;48(5):899-907. doi:10.1016/0092-8674(87)90086-9.

245. Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1990;9(10):3153-62. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07513.x.
246. Alarcon B, Berkhout B, Breitmeyer J, Terhorst C. Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma.delta.epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains. *Journal of Biological Chemistry.* 1988;263(6):2953-2961. doi:10.1016/S0021-9258(18)69161-6
247. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:629-62. doi: 10.1146/annurev.iy.06.040188.003213.
248. Kamiya T, Wong D, Png YT, Campana D. A novel method to generate T-cell receptor-deficient chimeric antigen receptor T cells. *Blood Adv.* 2018;2(5):517-528. doi:10.1182/bloodadvances.2017012823
249. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237-244. doi:10.1016/0167-5699(90)90097-S
250. Marcus A, Raulet DH. Evidence for natural killer cell memory. *Current Biology.* 2013;23(17). doi:10.1016/j.cub.2013.07.015
251. Jo S, Das S, Williams A, et al. Endowing universal CAR T-cell with immune-evasive properties using TALEN-gene editing. *Nat Commun.* 2022;13(1). doi:10.1038/s41467-022-30896-2
252. Wang D, Quan Y, Yan Q, Morales JE, Wetsel RA. Targeted Disruption of the  $\beta$  2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells . *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(10):1234-1245. doi:10.5966/sctm.2015-0049
253. Abrahami P, Chang WG, Kluger MS, et al. Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. *Circ Res.* 2015;117(2):121-128. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.306290
254. Kagoya Y, Guo T, Yeung B, et al. Genetic ablation of HLA class I, class II, and the T-cell receptor enables allogeneic T cells to be used for adoptive T-cell therapy. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(7):926-936. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0508

255. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res.* 2015;75(18):3853-3864. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3321
256. Mo F, Watanabe N, McKenna MK, et al. Engineered off-the-shelf therapeutic T cells resist host immune rejection. *Nat Biotechnol.* 2021;39(1):56-63. doi:10.1038/s41587-020-0601-5
257. Verweij MC, Horst D, Griffin BD, et al. Viral Inhibition of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP): A Striking Example of Functional Convergent Evolution. *PLoS Pathog.* 2015;11(4). doi:10.1371/journal.ppat.1004743
258. van de Weijer ML, Luteijn RD, Wiertz EJHJ. Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation. *Semin Immunol.* 2015;27(2):125-137. doi:10.1016/j.smim.2015.03.010
259. Røder G, Geironsen L, Bressendorff I, Paulsson K. Viral Proteins Interfering with Antigen Presentation Target the Major Histocompatibility Complex Class I Peptide-Loading Complex. *J Virol.* 2008;82(17):8246-8252. doi:10.1128/jvi.00207-08
260. Grauwet K, Berger T, Kann MC, et al. Stealth transgenes enable CAR-T cells to evade host immune responses. *J Immunother Cancer.* 2024;12(5). doi:10.1136/jitc-2023-008417
261. Reis G, dos Santos Moreira-Silva EA, Silva DCM, et al. Effect of early treatment with fluvoxamine on risk of emergency care and hospitalisation among patients with COVID-19: the TOGETHER randomised, platform clinical trial. *Lancet Glob Health.* 2022;10(1):e42-e51. doi:10.1016/S2214-109X(21)00448-4
262. Ahn K, Gruhler A. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity.* 1997;6(5):613-21. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80349-0.
263. Hwang JR, Byeon Y, Kim D, Park SG. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med.* 2020;52(5):750-761. doi:10.1038/s12276-020-0435-8
264. Courtney AH, Lo WL, Weiss A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(2):108-123. doi:10.1016/j.tibs.2017.11.008

265. Garnett C, Apperley JF, Pavlu J. Treatment and management of graft-versus-host disease: Improving response and survival. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(6):366-378. doi:10.1177/2040620713489842
266. Figueiredo C, Wedekind D, Müller T, et al. MHC Universal Cells Survive in an Allogeneic Environment after Incompatible Transplantation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-12. doi:10.1155/2013/796046
267. Wang X, Cabrera FG, Sharp KL, Spencer DM, Foster AE, Bayle JH. Engineering Tolerance toward Allogeneic CAR-T Cells by Regulation of MHC Surface Expression with Human Herpes Virus-8 Proteins. *Molecular Therapy*. 2021;29(2):718-733. doi:10.1016/j.ymthe.2020.10.019
268. Jonjić S, Babić M, Polić B, Krmpotić A. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):30-38. doi:10.1016/j.coi.2007.11.002
269. Lapteva N, Gilbert M, Diaconu I, et al. T-cell receptor stimulation enhances the expansion and function of CD19 chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(24):7340-7350. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3199
270. Stenger D, Stief TA, Kaeuferle T, et al. Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood*. 2020;136(12):1407-1418. doi:10.1182/blood.2020005185
271. Oh BLZ, Shimasaki N, Coustan-Smith E, et al. Fratricide-resistant CD7-CAR T cells in T-ALL. *Nat Med*. 2024. doi: 10.1038/s41591-024-03228-8.
272. Png YT, Vinanica N, Kamiya T, Shimasaki N, Coustan-Smith E, Campana D. Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen receptor targeting of T-cell malignancies. *Blood Adv*. 2017;1(25):2348-2360. doi:10.1182/bloodadvances.2017009928
273. Kalinin RS, Ukrainskaya VM, Chumakov SP, et al. Engineered Removal of PD-1 From the Surface of CD19 CAR-T Cells Results in Increased Activation and Diminished Survival. *Front Mol Biosci*. 2021;8. doi:10.3389/fmolb.2021.745286
274. Baker DJ, Arany Z, Baur JA, Epstein JA, June CH. CAR T therapy beyond cancer: the evolution of a living drug. *Nature*. 2023;619(7971):707-715. doi:10.1038/s41586-023-06243-w
275. Jean SS, Lee PI, Hsueh PR. Treatment options for COVID-19: The reality and challenges. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020;53(3):436-443. doi:10.1016/j.jmii.2020.03.034

276. Zaki MM, Lasha E, Said K, et al. *Cell therapy strategies for COVID-19: Current approaches and potential applications*. *Sci Adv*. 2021;7(33):eabg5995. doi: 10.1126/sciadv.abg5995.
277. Zavvar M, Yahyapoor A, Baghdadi H, et al. COVID-19 immunotherapy: Treatment based on the immune cell-mediated approaches. *Int Immunopharmacol*. 2022;107. doi:10.1016/j.intimp.2022.108655
278. Garcillán B, Salavert M, Regueiro JR, Díaz-Castroverde S. Response to Vaccines in Patients with Immune-Mediated Inflammatory Diseases: A Narrative Review. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(2). doi:10.3390/vaccines10020297
279. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A general introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol*. 2019;10(JULY). doi:10.3389/fimmu.2019.01545
280. Frey BM, Frey FJ. Clinical pharmacokinetics of prednisone and prednisolone. *Clin Pharmacokinet*. 1990;19(2):126-46. doi: 10.2165/00003088-199019020-00003.
281. Huang I, Pranata R. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care*. 2020;8(1):36. doi:10.1186/s40560-020-00453-4
282. Morte-Romea E, Pesini C, Pellejero-Sagastizábal G, et al. CAR Immunotherapy for the treatment of infectious diseases: a systematic review. *Front Immunol*. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1289303
283. Lickefett B, Chu L, Ortiz-Maldonado V, et al. Lymphodepletion – an essential but undervalued part of the chimeric antigen receptor T-cell therapy cycle. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1303935
284. Frigault M, Rotte A, Ansari A, Gliner B, Heery C, Shah B. Dose fractionation of CAR-T cells. A systematic review of clinical outcomes. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2023;42(1). doi:10.1186/s13046-022-02540-w
285. Wittibschlager V, Bacher U, Seipel K, et al. CAR T-Cell Persistence Correlates with Improved Outcome in Patients with B-Cell Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6). doi:10.3390/ijms24065688
286. Wu J, Wu W, Zhou B, Li B. Wu J, Wu W, Zhou B, Li B. Chimeric antigen receptor therapy meets mRNA technology. *Trends Biotechnol*. 2024;42(2):228-240. doi: 10.1016/j.tibtech.2023.08.005.

287. Carlson CJ, Albery GF, Merow C, et al. Climate change increases cross-species viral transmission risk. *Nature*. 2022;607(7919):555-562. doi:10.1038/s41586-022-04788-w

