



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Expresión de CD20 en linfocitos T con un receptor antigénico quimérico anti-CD19 para su selección o eliminación

Carolina Loreto Vera Sepulveda

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Programa de Doctorado en Biomedicina

**EXPRESIÓN DE CD20 EN LINFOCITOS T CON UN RECEPTOR
ANTIGÉNICO QUIMÉRICO ANTI-CD19 PARA SU SELECCIÓN
O ELIMINACIÓN**

TESIS DOCTORAL

CAROLINA VERA SEPÚLVEDA

BARCELONA-ESPAÑA

2022

Programa de Doctorado en Biomedicina

**EXPRESIÓN DE CD20 EN LINFOCITOS T CON UN RECEPTOR
ANTIGÉNICO QUIMÉRICO ANTI-CD19 PARA SU SELECCIÓN
O ELIMINACIÓN**



Carolina Vera Sepúlveda
Doctoranda



Manel Juan Otero
Director

**Esta tesis se ha llevado a cabo en el Centro de Investigación Biomédica
CELLEX del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
(IDIBAPS) de Barcelona, España**

Con cariño a mis padres, a mi hija Paulina y a Pablo

Agradecimientos

Agradezco de corazón a mis padres Juan y Norma, así como a mi hija Paulina y a mi pareja Pablo que me han apoyado y acompañado en este camino. Gracias al Dr. Manel Juan Otero, por acogerme como tutor/director en el Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) y permitirme desarrollar este trabajo. Esta tesis contó con el financiamiento del Programa de Becas Chile de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID). Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron en este proceso.

Muchas gracias

INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	XXIII
ABSTRACT	XXV
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Generalidades sobre el sistema inmune y su respuesta frente al cáncer.....	3
1.1.- Inmunovigilancia e immunoedición.....	4
1.2.- Evasión tumoral.....	6
1.3.- Los componentes de la respuesta inmune al cáncer.....	9
1.3.1.- Componentes celulares.....	9
1.3.2.- Componentes solubles.....	10
1.4.- Células T y cáncer.....	12
1.4.1.- Descripción.....	12
1.4.2.- Roles de las células T en cáncer.....	14
1.4.3.- Respuesta de las células T en cáncer.....	20
2.- La inmunoterapia antitumoral: una herramienta prometedora para el tratamiento del cáncer..	24
3.- Inmunoterapia antitumoral con células CART.....	27
3.1.- Receptores de antígeno quiméricos.....	28
3.1.1.- Diseño de los CARs.....	29
3.1.2.- Evolución de las células CART.....	36
3.2.- La inmunoterapia CART como tratamiento para neoplasias malignas de células B.....	38

3.2.1.- Los enfoques terapéuticos para las neoplasias malignas de células B.....	38
3.2.2.- El enfoque CART19.....	40
3.2.3.- Efectos adversos asociados a la terapia CART.....	43
3.2.4.- Avances y desafíos de la terapia CART en el tratamiento de las neoplasias malignas de células B.....	46
Hipótesis.....	52
2.- OBJETIVOS.....	53
1.- Objetivo general	55
2.- Objetivos específicos	55
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1.- Diseño del CAR y generación del plásmido pCCL-CAR19-2A-CD20	59
1.1.- Digestión de los plásmidos recombinantes con endonucleasas de restricción.....	60
1.2.- PCR convencional.....	60
1.3.- <i>Overlap</i> -PCR.....	63
1.3.1- PCR 1.....	65
1.3.2- PCR 2.....	65
1.3.3- PCR 3.....	66
1.4.- Electroforesis en geles de agarosa	67
1.5.- Purificación de DNA desde geles de agarosa	67
1.6.- Reconstitución del vector pCCL-CAR19-2A-CD20	68
1.7.- Elaboración de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar.....	68
1.8.- Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	69
1.9.- Purificación de DNA plasmídico	70
1.10.- Cuantificación de DNA.....	71

1.11.- Diseño de cebadores y análisis de las secuencias nucleotídicas.....	71
2.- Cultivo de células primarias y líneas celulares	72
2.1.- Linfocitos T primarios	72
2.2.- Líneas celulares	73
3.- Transformación transitoria en células HEK293T	73
4.- Producción lentiviral	74
5.- Titulación lentiviral.....	75
6.- Estimulación, transducción y expansión de linfocitos T primarios humanos.....	76
7.- Análisis por citometría de flujo	77
8.- Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad y de liberación de citocinas	78
9.- Ensayo de depleción con rituximab.....	80
10.- Evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia de las células CART19 y su eliminación con rituximab en un modelo murino de xenoinjerto de B-ALL.....	81
4.- RESULTADOS.....	83
1.- Expresión del plásmido pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 en células HEK293T	85
2.- Construcción del plásmido pCCL-CAR19-2A-CD20	87
2.1.- PCR 1	87
2.2.- PCR 2	87
2.3.- PCR 3	88
2.4.- Digestión del producto de la PCR 3	90
3.- Expresión del CAR19 y el CD20 en la superficie de las células T	92
4.- Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de las células CART19-CD20	95
5.- Análisis de citocinas producidas por las células CART19-CD20	97
6.- Depleción <i>in vitro</i> de las células CART19-CD20 mediado por el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab	99

7.- Evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia de las células CART19-CD20 y su eliminación con rituximab en un modelo murino de xenoinjerto de B-ALL	101
5.- DISCUSIÓN.....	103
6.- CONCLUSIONES.....	119
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	123

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema de inmuoedición del cáncer.....	8
Figura 1.2: Principio general de la terapia con células CART.....	28
Figura 1.3: Diseño general de un CAR	35
Figura 1.4: Estructura de las diferentes generaciones de CARs.....	38
Figura 3.1: Vectores plasmídicos pCCL-CAR19 y pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20.....	59
Figura 3.2: Digestión de los vectores pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 y pCCL-CAR19.....	61
Figura 3.3: Estrategia para elaborar el constructo pCCL-CAR19-2A-CD20 A partir de la clonación de 2A-CD20 en el vector pCCL-CAR19.....	61
Figura 3.4: Estrategia para elaborar el constructo pCCL-CAR19-2A-CD20 a partir de la clonación del fragmento que comprende la segunda mitad del CAR19 + 2A + CD20 en el vector pCCL conteniendo la primera mitad del CAR19.....	64
Figura 3.5: Línea de tiempo del experimento de xenoinjerto de leucemia linfoblástica aguda de células B humano en ratones	82
Figura 4.1: Análisis por citometría de flujo de células HEK293T transducidas con el vector pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20.....	86
Figura 4.2: Geles de agarosa mostrando los fragmentos amplificados por PCR1, PCR2 y PCR3.....	89
Figura 4.3: Geles de agarosa mostrando la digestión del fragmento cercano a 1650 pb obtenido y purificado a partir de la PCR3	91
Figura 4.4: Análisis por citometría de flujo de células HEK293T transducidas con el vector lentiviral pCCL-CAR19-2A-CD20	93
Figura 4.5: Análisis por citometría de flujo de linfocitos T transducidos con el vector lentiviral pCCL-CAR19-2A-CD20	94
Figura 4.6: Actividad citotóxica de las células CART19-CD20, CART19 y células no transducidas frente a células NALM6.....	96
Figura 4.7: Niveles de citocinas INF- γ , IL-17a e IL-10.....	98
Figura 4.8: Ensayo basado en citotoxicidad mediado por complemento.....	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Subpoblaciones de células T.....	14
Tabla 3.1: Secuencia nucleotídica de los cebadores F y R utilizados para amplificar el fragmento 2A-CD20 mediante PCR convencional.....	62
Tabla 3.2: Secuencia nucleotídica de los cebadores y oligos específicos utilizados para amplificar el fragmento que comprende la segunda mitad del CAR19 y el CD20 mediante <i>Overlap</i> -PCR.....	64

ABREVIATURAS

4-1BBL=	ligando de 4-1BB
7-AAD=	<i>7-aminoactinomycin D</i>
ACT=	transferencia celular adoptiva
ADCC=	citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
AEMPS=	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AKT=	<i>serine/threonine protein kinase B</i>
ALL=	leucemia linfoblástica aguda
APC=	célula presentadora de antígeno
APC=	aloficocianina
Arg=	arginina
ASN=	asunaprevir
ATCC=	American Type Culture Collection
B-ALL=	leucemia linfoblástica aguda de células B
Bcl-2=	<i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i>
BCMA=	antígeno de maduración de células B
BCR=	receptor de antígeno de los linfocitos B (<i>B cell receptor</i>)
Bid=	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BiTE=	molécula biespecífica captadora de células T (<i>bispecific T-cell engager</i>)
Bregs=	B reguladoras
btCD8=	región bisagra y transmembrana de CD8
CAR=	receptor de antígeno quimérico
CAR-BBIR=	CAR de unión a biotina
CAR-SUPRA=	<i>split, universal and programmable (SUPRA) CAR system</i>
CART=	linfocitos T con receptor de antígeno quimérico
CART19=	linfocitos T con receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19
CART-A3B1=	células CART anti-CD19 con scFv del anticuerpo A3B1
CART-CE7R=	células CART dirigidas al epítipo CE7 de L1-CAM (CE7R)
CART-FRα=	células CART dirigidas al receptor de folato <i>alfa</i>
CART-GD2=	células CART dirigidas al disial gangliosido 2
CART-iCasp9=	células CART conteniendo un interruptor genético de caspasa 9 inducible

CART-HER2=	células CART dirigidas al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)
CART-MFEζ=	células CART CD3ζ dirigidas al antígeno carcinoembrionario
CART-MOv19-BBζ=	células CART conteniendo un scFv del receptor de folato <i>alfa</i> (MOv19) fusionado con CD3ζ en combinación con el dominio coestimulador 4-1BB en tándem (MOv19-BBζ)
CART-scFv(G250)=	células CART conteniendo un scFv del anticuerpo monoclonal G250 murino
Casp 9=	caspara 9
CBP=	<i>C-terminal Src kinase-binding protein</i>
CCR=	<i>CC chemokine receptor</i>
CCL=	<i>CC chemokine ligand</i>
CD=	<i>cluster of differentiation</i>
CD3ζ=	cadena <i>zeta</i> del CD3
CD40L=	ligando para CD40
CDC=	citotoxicidad dependiente de complemento
CH=	cadena pesada
CKI=	proteína inhibidora de CDK
CMV=	citomegalovirus
COX-2=	ciclooxigenasa 2
CRISPR/Cas9=	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase 9</i>
CRS=	síndrome de liberación de citocinas
CSF-1=	factor estimulador de colonias-1 (<i>colony stimulating factor-1</i>)
CTL=	linfocito T citotóxico
CTLA-4=	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
CXCL1=	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DC=	célula dentrítica
dcCAR=	CAR de doble cadena
DLBCL=	linfoma difuso de células B grandes
DMEM=	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO=	dimetil sulfóxido
DNA=	ácido desoxirribonucleico
dNTPs=	desoxirribonucleótidos trifosfato
E2A=	péptido autoescindible derivado del virus de la rinitis equina A
ECM=	matriz extracelular

EDTA=	ácido etilendiaminotetraacético
EF-1α=	<i>human elongation factor 1 alpha</i>
EGF=	factor de crecimiento epitelial
EMA=	Agencia Europea de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
ErbB=	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
ERK=	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
E:T=	ratios efectoras : target
F2A=	péptido autoescindible derivado del virus de la fiebre aftosa
Fab=	fragmento de unión al antígeno (<i>fragment antigen-binding</i>)
FasL=	ligando de Fas
FBS=	suero fetal bovino
Fc=	fragmento cristalizable (<i>fragment crystallizable</i>)
FcϵRIγ=	receptor de alta afinidad para la región Fc de la IgE
FDA=	Agencia Americana de Medicamentos y Alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FGF=	factor de crecimiento de fibroblastos
FITC=	isotiocianato de fluoresceína
FL=	linfoma folicular
GAB1=	proteína de unión asociada a GRB2 1 (<i>GRB2-associated-binding protein 1</i>)
GFP=	proteína verde fluorescente
GLOBOCAN=	Global Cancer Observatory: CANCER TODAY
Gly=	glicina
GM-CSF=	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HEPES=	ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico
HER-2=	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HGBCL=	linfoma de células B de alto grado
HLA=	antígenos leucocitarios humanos
HSCT=	trasplante de células madres hematopoyéticas
HSV-TK=	timidina quinasa del virus del herpes simple
huCART19=	linfocitos T con receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 con un scFv humanizado
huEGFRt=	receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncado
IARC=	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
ICANS=	<i>immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>

iCasp9=	caspara 9 inducible
ICOS=	coestimulador de células T inducible (<i>inducible T cell coestimulator</i>)
IDO=	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IDT=	Integrated DNA Technologies®
Ig=	inmunoglobulina
IgG-κ=	cadena <i>kappa</i> de la IgG
IL=	interleucina
IL-2Rα=	cadena <i>alfa</i> del receptor de interleucina-2
IL-2Rβ=	cadena β del receptor de interleucina-2
IL-6R=	receptor de IL-6
IL-13Rα2=	subunidad <i>alfa</i> -2 del receptor de interleucina-13
ILT=	<i>immunoglobulin-like transcript</i>
INF-α/β=	interferón <i>alpha/beta</i>
INF-γ=	interferón <i>gamma</i>
IP=	intraperitoneal
IRES=	inserción de sitios de entrada ribosomales internos
IV=	intravenoso
ITAM=	motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina
JAK-STAT=	<i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
LAG-3=	<i>lymphocyte activation gene-3</i>
LB=	Luria-Bertani
LCR=	líquido cefalorraquídeo
LFA-1=	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LLC=	leucemia linfática crónica
LNH=	linfoma no Hodgkin
LNH-B=	linfoma no Hodgkin de células B
MAGE-1=	<i>melanoma-associated antigen 1</i>
MAPK=	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAS/HLH=	síndrome de activación de macrófagos/linfocitosis hemofagocítica
MCL=	linfoma de células de manto
MCP-1=	proteína quimioatrayente de monocitos-1
MDSCs=	células derivadas de mieloides supresoras
MEM=	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC-I=	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

MHC-II=	complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MIP-1β=	proteína inflamatoria de los macrófagos-1 <i>beta</i>
MM=	mieloma múltiple
MMP=	metaloproteinasa
M.O.I=	multiplicidad de infección (<i>Multiplicity of Infection</i>)
NEAA=	<i>Non-Essential Amino Acids</i>
NF-κB=	factor nuclear <i>kappa</i> B
NK=	<i>natural killer</i>
NKG2D=	receptor activador de células NK grupo 2, miembro D
NKG7=	<i>NK cell granule protein 7</i>
NKR=	<i>NK cell receptor</i>
NKT=	T <i>natural killer</i>
Oct=	factor de transcripción de unión a octamero
OFF-switch CAR=	CAR con interruptor de apagado
ON-switch CAR=	CAR con interruptor de encendido
OMS=	Organización Mundial de la Salud
ORF=	marco abierto de lectura
P2A=	péptido autoescindible derivado del teschovirus porcino
PBS=	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR=	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1=	<i>programmed cell death protein-1</i>
PD-L1=	ligando 1 de muerte programada
PE=	ficoeritrina
PEI=	polietilenimina
PGE2=	prostaglandina E2
PI3K=	fosfatidilinositol 3-quinasa
PMBCL=	linfoma mediastinal primario de células B grandes
PBMCs=	células mononucleares de sangre periférica
PNE=	péptido neoepítipo
p/v=	peso/volumen
RC=	respuestas completas
REV=	<i>regulator of virion expression</i>
RNA=	ácido ribonucleico
RNS=	especies reactivas del nitrógeno

RPMI=	medio Roswell Park Memorial Institute
ROS=	especies reactivas del oxígeno
R/R=	recurrente/refractario
RRE=	<i>Rev response element</i>
scFv=	fragmento variable de cadena simple
Ser=	serina
SLAMF7=	miembro 7 de la familia SLAM
SLOs=	órganos linfoides secundarios
SMAC=	complejo de activación supramolecular
SMASh-CAR=	CAR de apagado asistido por moléculas pequeñas basados en proteasas (<i>protease-based small molecule-assisted shutoff</i> CAR)
SNC=	sistema nervioso central
S.O.C=	<i>Super Optimal Broth</i>
Src=	<i>proto-oncogene non-receptor tyrosine kinase</i>
STAT3=	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SWIFF-CAR=	CAR con interruptor de apagado (<i>switch-off</i> CAR)
SYK=	<i>spleen tyrosine kinase</i>
T2A=	péptido autoescindible derivado del virus thosa asigna
TAA=	antígeno asociado a tumor
TAMs=	macrófagos asociados a tumores
TanCAR=	CAR en <i>tándem</i>
TANs=	neutrófilos asociados a tumores
TGF-β=	factor de crecimiento transformante <i>beta</i>
TBE=	<i>buffer</i> Tris/borato/EDTA
T_{CM}=	T de memoria central
TCR=	receptor de los linfocitos T (<i>T cell receptor</i>)
T_{EM}=	T de memoria efectoras
T_{fh}=	T <i>helper</i> foliculares
T_h=	T <i>helper</i>
TIBs=	linfocitos B infiltrantes de tumores
TILs=	linfocitos T infiltrantes de tumores
TIR=	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR=	<i>Toll-like receptor</i>
TLS=	síndrome de lisis del tumor

T_m =	<i>melting temperature</i>
TME =	microambiente tumoral
TNF-α =	factor de necrosis tumoral <i>alfa</i>
TNFR =	receptores del factor de necrosis tumoral
Tr1 =	T reguladoras de tipo 1
TRAF =	factor asociado al receptor de TNF
TRAIL =	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tregs =	T reguladoras
TruCs =	<i>T cell receptor fusion constructs</i>
TRUCKs =	células T redirigidas para la muerte universal mediada por citocinas (<i>T cell redirected for universal cytokine-mediated killing</i>)
TSAs =	antígenos específicos de tumores
T_{SCM} =	T <i>stem</i> de memoria
TSLPR =	receptor de linfopoyetina del estroma tímico
T_{TE} =	T efectoras terminales
TU =	unidades de transducción
UCART19 =	terapia con células CART anti-CD19 alogénica y universal
UIRs =	receptores inmunes universales
uPA =	activador del plasminógeno tipo uroquinasa
Upenn-CHOP =	Universidad de Pensilvania-Children's Hospital of Philadelphia
UV =	ultravioleta
VEGF =	factor de crecimiento endotelial vascular
VISTA =	<i>V domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation</i>
VLA-4 =	<i>very late antigen-4</i>
VSV-G =	<i>glycoprotein of the vesicular stomatitis virus</i>
v/v =	volumen/volumen
WHO =	<i>World Health Organization</i>

RESUMEN

Varias inmunoterapias tumorales han demostrado ser altamente eficientes, como es el caso de los ya incuestionables resultados obtenidos con la terapia de células T que expresen receptores frente a antígeno quiméricos (CART). El enfoque terapéutico conocido con el nombre de CART19 ha pasado de ser sólo una oportunidad experimental atractiva a ser una nueva y revolucionaria modalidad de tratamiento para neoplasias malignas de células B CD19+, luego de que en ensayos clínicos multicéntricos internacionales se obtuvieran respuestas clínicas espectaculares y un incremento claro en la supervivencia general. El éxito de las terapias CART19 es indiscutible, sin embargo, éstas han sido vinculadas al desarrollo de eventos adversos graves que pueden poner en peligro la vida o que provocan la suspensión de la terapia. Para abordar estos desafíos, se han desarrollado estrategias novedosas basadas en la inclusión de genes suicidas, conocidos como “interruptores suicidas” o “interruptores de apagado”, en las células transducidas, para la eliminación confiable y completa de las células CART después de inducir la remisión de la leucemia. Aquí proponemos un nuevo mecanismo dentro del enfoque CART19 para inducir la eliminación citotóxica rápida de estas células sintéticas una vez que hayan erradicado las células leucémicas, como medida de urgencia ante la ocurrencia de eventos adversos severos o incluso para facilitar un trasplante de células madres hematopoyéticas exitoso. Desarrollamos células T con una nueva construcción CAR de cuarta generación dirigido a CD19 y coexpresando el marcador de superficie CD20, el CAR19-2A-CD20, conformado por la cadena simple del fragmento variable (scFv) del anticuerpo monoclonal anti-CD19 A3B1, la región bisagra y transmembrana de CD8 (btCD8), más los dominios de señalización 4-1BB y CD3 ζ , seguido de 2A y CD20, este último la etiqueta celular objetivo para rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20). Comprobamos que nuestro método de producción de células CART, utilizando un vector lentiviral de tercera generación, es efectivo y robusto. Pudimos demostrar *in vitro* que las células CART19-CD20 exhiben especificidad y una sólida actividad citotóxica contra células leucémicas B CD19+, inducen la liberación de citocinas proinflamatorias requerible para su función y a su vez son susceptibles a ser reducidas rápidamente con rituximab. Concluimos que nuestras células CART19-CD20 presentan el funcionamiento necesario para poder ser eficaces en la clínica, de modo que este modelo puede contribuir al desarrollo de una nueva y mejor estrategia para tratar neoplasias malignas de células B CD19+ con mitigación potencial de la toxicidad a través de una reducción citotóxica de las células CART mediada por rituximab. El camino de este enfoque hacia la traducción clínica involucra proseguir con los estudio *in vivo* para probar el efecto de nuestras células CART19-CD20 y comprobar fehacientemente su susceptibilidad a ser depleccionadas con el anticuerpo anti-CD20 rituximab. Esto último permitirá pasar a las instancias de ensayos clínicos, donde las evaluaciones cuidadosas y rigurosas en los pacientes brindarán las respuestas definitivas.

ABSTRACT

Many tumour immunotherapies have proven to be highly efficient, as the case of the already unquestionable results obtained with chimeric antigen receptor-expressing T-cell therapy (CART). The therapeutic approach, known as CART19, has turned from being just an attractive experimental opportunity to a revolutionary new treatment modality for CD19+ B-cell malignancies, after spectacular clinical responses and a clear increase in survival in general. The success of CART19 therapies is unquestionable, however, they have been linked to the development of serious adverse events that can be life-threatening or lead to discontinuation of therapy. To address these challenges, novel strategies have been developed based on the inclusion of suicide genes, known as “suicide switches” or “off switches”, in the transduced cells, for the reliable and complete elimination of CART cells after induction of the leukaemia remission. Here we propose a new mechanism within the CART19 approach to induce the rapid cytotoxic elimination of these synthetic cells once they have eradicated the leukemic cells, as an emergency measure in severe adverse events, or even to facilitate a successful hematopoietic stem cell transplant. We developed T cells with a new CAR fourth-generation construct targeting CD19 and co-expressing the CD20 surface marker, CAR19-2A-CD20, made up of the single-chain variable fragment (scFv) of the anti-CD19 monoclonal antibody A3B1, the CD8 hinge and transmembrane region, plus signalling domains 4-1BB and CD3 ζ , followed by 2A and CD20, the latter the target cell label for rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody). We verified that our CART cell production method, using a third-generation lentiviral vector, is effective and robust. We were able to demonstrate *in vitro* that CART19-CD20 cells exhibit specificity and robust cytotoxic activity against CD19+ leukemic B cells, induce the release of proinflammatory cytokines required for their function, and in turn, are susceptible to rapid reduction with rituximab. We conclude that our CART19-CD20 cells have the necessary functionality to be effective in the clinic so that this model can contribute to the development of a new and better strategy to treat CD19+ B-cell malignancies with potential mitigation of toxicity through a rituximab-mediated cytotoxic reduction of CART cells. The path of this approach towards clinical translation involves continuing with *in vitro* studies to test the effect of our CART19-CD20 cells and reliably verify their susceptibility to being depleted with the anti-CD20 antibody rituximab. The latter will make it possible to move on to clinical trial instances, where careful and rigorous evaluations of patients will provide definitive answers.

1.- INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre el sistema inmune y su respuesta frente al cáncer

La defensa de los mamíferos está a cargo del sistema inmune, cuyo rol fundamental es identificar y generar una respuesta apropiada frente a numerosas amenazas de origen exógeno y endógeno, destinada a eliminarlas o neutralizarlas, manteniendo la tolerancia hacia los tejidos propios. Constituido por glóbulos blancos y órganos y tejidos del sistema linfoide, incluidos el timo, el bazo, las amígdalas, los ganglios linfáticos, los vasos linfáticos, y la médula ósea, el sistema inmunológico generalmente se divide en dos componentes: inmunidad innata e inmunidad adquirida o adaptativa. Esta división se trata meramente de una simplificación, puesto que los dos tipos de inmunidad a menudo tienen funciones superpuestas y están estrechamente relacionadas, sin embargo, cada una de ellas presenta características distintivas.

La inmunidad innata es inespecífica, evolutivamente conservada y la que inicia la respuesta protectora. Está presente desde el nacimiento y activa una respuesta inmune rápida y no específica (independiente de los antígenos) basada en la liberación de citocinas que median varias funciones inmunes. Compuesto por barreras físicas que incluyen piel y membranas mucosas, barreras fisiológicas que incluyen temperatura y pH, y células no específicas, como son los neutrófilos, mastocitos, células dendríticas y macrófagos, constituyen la primera línea de defensa del cuerpo y montan una respuesta primaria que si no es suficiente, deriva a una respuesta más específica conducida por el sistema inmune adaptativo o adquirido. [1]

La inmunidad adaptativa o adquirida, en contraste con la inmunidad innata, genera una respuesta tardía, es específica a un antígeno determinado y desarrolla una memoria inmunológica que permite al sistema inmune reconocer un antígeno al que ha sido expuesto previamente, conduciendo a una respuesta inmune más rápida y vigorosa tras la re-exposición. Ejerce su efecto mediante la producción de anticuerpos por parte de las células B (inmunidad humoral) y la acción de las células presentadoras sobre las células T colaboradoras y las células T citotóxicas (inmunidad celular). [1]

Una gran cantidad de evidencia muestra que el mecanismo defensivo frente a células cancerosas implica una coordinación entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, donde una multitud de tipos de células inmunes y sus moléculas asociadas están involucradas en su reconocimiento y eliminación. La activación de la inmunidad innata conduce a la preparación eficiente de las respuestas inmunes adaptativas mediadas por los linfocitos B y T. Tras reconocer antígenos tumorales, estas células desencadenan una destrucción específica de los tumores sin toxicidad para el tejido normal y con desarrollo de memoria a largo plazo que puede prevenir la recurrencia del cáncer. Sin embargo, este proceso capaz de detener o controlar el desarrollo de tumores a largo plazo,

conocido con el nombre de inmunovigilancia, es evadido por muchos tipos de cáncer en un juego donde intervienen una serie de factores que interfieren con una respuesta antitumoral efectiva y de eliminación del tumor. Esta supresión inmune profunda proviene de la capacidad de las células tumorales para subvertir la regulación inmune normal y con el apoyo de múltiples tipos de células, crear un microambiente inmunosupresor que previene las acciones de las células inmunes y favorece la progresión del cáncer. [2, 3]

Las estrategias terapéuticas contra el cáncer están centradas principalmente en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia endocrina y para las neoplasias onco-hematológicas se incluye el trasplante celular hematopoyético. Si bien estas terapias muchas veces son efectivas en el combate a tumores o en el mejoramiento de la supervivencia, a menudo alcanzan un período refractario que conduce al fracaso del tratamiento y a la recaída, a la vez que están asociadas con grandes toxicidades. Esta efectividad deficiente de las terapias, especialmente en pacientes con cáncer en etapa avanzada, ha puesto todos los esfuerzos en buscar nuevas estrategias y es así como la inmunoterapia ha nacido y se ha convertido en una herramienta poderosa y con menor toxicidad para el tratamiento del cáncer. [4]

La inmunoterapia ha generado expectativas sin precedentes en el tratamiento del cáncer. Basada en la capacidad del sistema inmune para identificar antígenos asociados a tumores (TAAs) y dirigir una respuesta inmune contra las células portadoras de TAAs, varias estrategias en fase de ensayos clínicos han demostrado ser altamente eficientes, tal que ya existen algunas aprobadas para múltiples cánceres. Es el caso de los sorprendentes resultados obtenidos con los inhibidores inmunes *checkpoint* y con la terapia de células T expresando receptores de antígeno quiméricos (CART), tanto que esta última ya fue aprobada y está disponible actualmente como tratamiento para algunas neoplasias malignas de células B CD19+. [4, 5, 6]

Si bien la inmunoterapia ha mostrado resultados exitosos en múltiples cánceres, especialmente en los ensayos clínicos más recientes con células CART, existen pacientes que no responden a este tratamiento o se producen en ellos eventos adversos graves relacionados con el sistema inmunitario que ponen en peligro su vida o que provocan la suspensión de la terapia. Por este motivo, la investigación actual está enfocada en mejorar la eficacia y reducir la toxicidad de las inmunoterapias para así mejorar tanto la calidad de vida del paciente como los resultados del tratamiento.

1.1. Inmunovigilancia e immunoedición

El trabajo de los inmunólogos más influyentes de los últimos 100 años ha estado focalizado en estudiar el rol del sistema inmune en el cáncer. Destacan las contribuciones iniciales de Paul Ehrlich con su hipótesis de que el sistema inmune podía controlar tumores, la que pudo ser más clarificada en la década de 1950 con los trabajos de

Medawar y col., que permitieron comprender el rol crítico de los componentes celulares del sistema inmune en el reconocimiento y destrucción de tumores trasplantados en ratones. Estos avances permitieron argumentar la existencia de TAAs que son detectados por el sistema inmune y promovieron el desarrollo de una nueva era dentro de la inmunología, focalizada en dilucidar los mecanismos que intervienen en la interacción entre el sistema inmune y el cáncer. Así, en 1950, estos emergentes descubrimientos fueron incorporados formalmente por Burnet y Thomas en la hipótesis conocida como "inmunovigilancia del cáncer", la que especulaba que los linfocitos actuaban como centinelas al reconocer y eliminar las células transformadas nacientes que surgen continuamente. Esta hipótesis rápidamente condujo a innumerables experimentos para ser probada, sin embargo, a falta de resultados concluyentes, este concepto quedó por un tiempo en el olvido y resurgió nuevamente a mediados de los años 70 con el descubrimiento de las células *natural killer* (NK). En la década de los 90, importantes hallazgos relacionados con el rol protector del interferón gamma (INF- γ) frente a tumores y con los mecanismos que median la destrucción de células cancerosas por parte de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células NK, aportaron importante evidencia de los componentes del sistema inmune involucrados en controlar el desarrollo tumoral. Estudios en años posteriores comprobaron el involucramiento tanto del sistema inmune innato como del adaptativo en el control de la formación de tumores, demostrándose la participación de las células T *natural killer* (NKT), células NK, células T $\gamma\delta$, células T $\alpha\beta$, INF- γ e interleucina 12 (IL-12). [7]

El año 1991 fue un año importante para la inmunología tumoral humana y en especial para el conocimiento de los antígenos tumorales. Van der Bruggen y col. identificaron el gen MAGE-1 que codifica el antígeno de melanoma humano MZ2-E, sólo expresado en células de melanoma humano y, con la excepción de las células germinales testiculares, no expresado en el tejido adulto normal. Esta proteína pudo ser reconocida *in vitro* por CTLs derivados del paciente portador del tumor tras enfrentarlos a líneas celulares de melanoma que expresaban el gen MAGE-1 [8]. Este descubrimiento motivó muchos estudios similares que sentaron las bases para una mayor comprensión sobre los buenos objetivos a dirigir en inmunoterapias contra el cáncer.

En los años siguientes, la inmunología celular y molecular cobró gran relevancia y numerosos estudios proporcionaron un fuerte soporte para la existencia y relevancia fisiológica de la inmunovigilancia del cáncer. Contribuyeron de manera importante varios estudios basados en pacientes con melanomas cutáneos, los cuales mostraron una correlación positiva entre la presencia de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) y el aumento en la sobrevida, pronóstico que incluso pudo apreciarse en casos de melanoma con metástasis a ganglios linfáticos. Investigaciones posteriores también evidenciaron esta correlación en otros tipos de cáncer y mostraron que las células T CD8⁺ son la población de linfocitos relevante en esta supervivencia. [7, 9, 10]

En el nuevo milenio, continuaron las investigaciones destinadas a dilucidar los componentes inmunológicos que participan en este proceso heterogéneo y a ellas se

sumaron otras focalizadas en entender cómo ocurre la evasión tumoral de los mecanismos de inmunovigilancia a pesar de la fuerte presión selectiva que coloca el sistema inmunitario sobre los tumores. Destacaron aquellas que mostraron que los tumores son estampados por el medio ambiente inmunológico en el cual se forman, en un proceso que conduce a la generación de tumores resistentes a las acciones supresoras del sistema inmune. La evidencia dedujo que el sistema inmune tiene la capacidad de eliminar las células tumorales de inmunogenicidad intrínsecamente alta, dejando atrás variantes tumorales de inmunogenicidad reducida, y esto obedecía a la inestabilidad genética inherente de los tumores, donde algunas células tumorales tienen mutaciones en las vías relacionadas con la detección inmune y eliminación, permitiéndoles que sobrevivan, proliferen y maten al paciente. Debido a este rol dual del sistema inmune en la eliminación de tumores y en la capacidad de estampar fenotipos inmunogénicos en los tumores en desarrollo, fue preciso readecuar el término “inmunovigilancia” dentro de un concepto más general que se denominó “inmunoedición del cáncer”. [7]

El proceso de “inmunoedición del cáncer” (**Figura 1.1**) reconoce que en diferentes individuos y con diferentes tipos de cáncer se puede tener al menos tres diferentes pero relacionadas fases: eliminación, equilibrio y escape. La primera es la fase de eliminación y en ella la inmunovigilancia está activa, de forma que las células que se vuelven malignas o potencialmente malignas pueden ser inicialmente identificadas y eliminadas por el sistema inmunológico, primeramente a través de la inmunidad innata y luego por la inmunidad específica. En la segunda fase, de equilibrio, aquellas células tumorales no destruidas por el sistema inmunológico durante la eliminación, en esta etapa todavía no pueden ser destruidas ni tampoco pueden progresar; de modo que hay una coexistencia entre las células tumorales y el sistema inmunológico que puede permanecer por años. La tercera fase de la inmunoedición corresponde al escape o evasión, donde las células cancerosas pueden crecer y hacer metástasis, debido a que el sistema inmune se ve sobrepasado y ya no puede contener el crecimiento de células malignas. Mecanismos supresores del sistema inmunológico propios de la célula tumoral o derivados de adquisiciones genéticas, así como la expresión de moléculas de puntos de control inmunológico en su superficie, conducen a una falta de control y deficiencias en la eliminación por parte del sistema inmune. [1, 11]

1.2. Evasión tumoral

Los mecanismos de evasión de las células tumorales al ataque inmunológico se pueden agrupar en dos estrategias: i) evitar el reconocimiento inmunológico y ii) instar un microambiente tumoral (TME) inmunosupresor. La primera de ellas está basada en que las células cancerosas pueden perder la expresión de antígenos tumorales en la superficie celular y con ello evitar ser reconocidas por las células T. En este sentido, las mutaciones y deleciones pueden dar como resultado una pérdida de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), conduciendo a un escape inmune por presentación de menos antígenos y, por otro lado, de moléculas coestimuladoras, lo que puede

probablemente conferir resistencia a moléculas de las células T efectoras como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ . En la segunda estrategia, los factores derivados de las células cancerosas instan a una TME inmuno-tolerante mediante: (1) la secreción de moléculas supresoras como IL-10, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), prostaglandina E2 (PGE2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros; (2) expresión de moléculas de puntos de control inhibitorias como el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) y VISTA (*V domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation*); y (3) inducción del reclutamiento de macrófagos asociados a tumores (TAMs), neutrófilos asociados a tumores (TANs), células derivadas de mieloides supresoras (MDSCs) y células T reguladoras (Tregs) por quimiocinas derivadas de tumores como CCL2, CSF-1, CCL5, CCL22, CXCL5, CXCL8 y CXCL12. Estas estrategias en su conjunto dan como resultado un sistema complejo y eficiente para la evasión inmunológica. [12] (Ver **Figura 1.1**)

En la última década y a la luz de los nuevos hallazgos que atribuyeron la supresión inmune a la capacidad de los tumores para subvertir la regulación inmune normal en su beneficio, los estudios pasaron a enfocarse en el huésped y en las contribuciones del “microambiente tumoral”. Las investigaciones determinaron que la inflamación crónica asociada al cáncer está presente en las diferentes etapas de la tumorigénesis y contribuye a la inestabilidad genómica, la modificación epigenética, la inducción de la proliferación de células cancerosas, la mejora de las vías antiapoptóticas del cáncer, la estimulación de la angiogénesis, la remodelación tisular y, finalmente, la metástasis. Adicionalmente, los estudios también permitieron constatar que la inflamación tiene influencias en la terapia del cáncer, evidenciándose el rol dual de muchos de los mediadores inflamatorios, donde algunas citocinas inflamatorias son necesarias para la eficacia de la terapia contra el cáncer, mientras que otras pueden anular el efecto de la terapéutica, promoviendo incluso la resistencia tumoral a la terapia. [13]

La interacción dual entre el cáncer y el sistema inmune motivó a que Hanahan y Weinberg en el año 2011 propusieran dentro de los nuevos sellos distintivos adicionales del cáncer: 1) la capacidad de evadir la destrucción inmunológica que resulta en inflamación aguda y eliminación del cáncer; 2) el potencial de la inflamación crónica que promueve el crecimiento tumoral en lugar de la eliminación [11, 14]. Lo anterior derivó a que los estudios de los últimos años se hayan centrado en comprender el papel que juegan el TME y las células inmunitarias inflamatorias, así como también algunas citocinas, quimiocinas y otras moléculas del sistema inmunológico. Dado que en estos procesos están involucrados todos los mecanismos efectores inmunes innatos y adaptativos conocidos, es clave descifrar las interacciones a nivel molecular y celular entre sus componentes para continuar desarrollando y mejorando estrategias inmunoterapéuticas que logren una respuesta antitumoral efectiva.

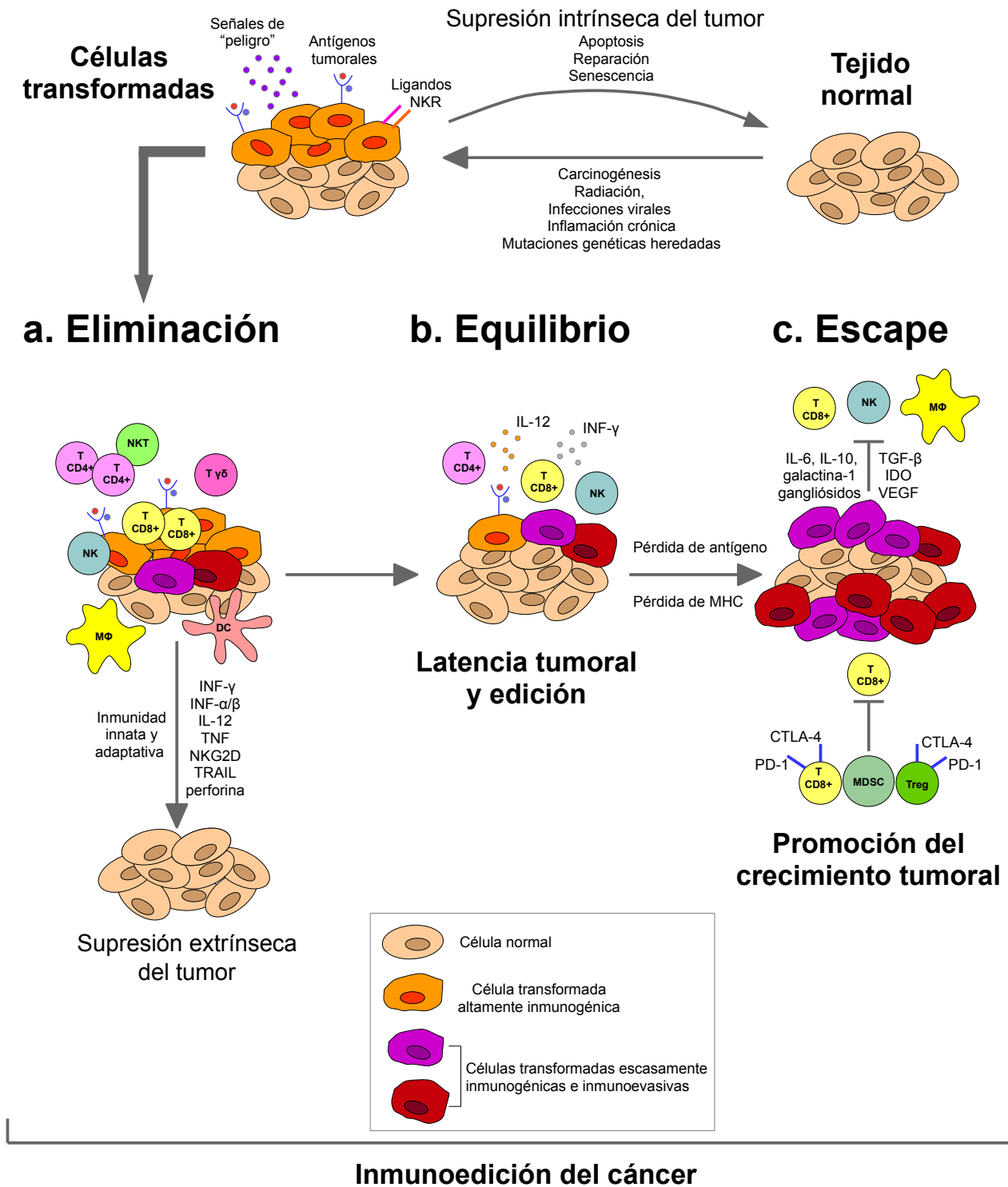


Figura 1.1: Esquema de immunoedición del cáncer.

1.3. Los componentes de la respuesta inmune al cáncer

1.3.1. Componentes celulares

La evolución de las células tumorales es apoyada colectivamente por una diversidad de células accesorias normales residentes y reclutadas (células que forman la vasculatura hematógena y linfática, células de soporte mesenquimales específicas de tejido y células inmunes de linaje mieloide y linfoide) que se integran con las matrices dinámicas solubles e insolubles, constituyendo lo que se conoce como el "estroma tumoral". Las investigaciones de los últimos años han estado focalizadas en revelar cómo las interacciones recíprocas entre las células accesorias, sus mediadores, los componentes estructurales de la matriz extracelular (ECM) y las células neoplásicas alteradas genéticamente, son capaces de regular todos los aspectos de la tumorigenicidad [13]. Dada su presencia prominente en todos los cánceres, los principales esfuerzos se han dirigido a las células inmunes para comprender su impacto en el destino del tumor en diferentes etapas de la enfermedad: transformación neoplásica temprana, tumores detectados clínicamente, diseminación metastásica e intervención terapéutica.

En la regulación de la respuesta inmune al cáncer destacan especialmente los roles claves que juegan ciertas poblaciones celulares. Es el caso de las células NK y T CD8+ que han mostrado que durante las primeras etapas del desarrollo tumoral son capaces de reconocer y eliminar exitosamente las células cancerosas más inmunogénicas; sin embargo, esta capacidad puede ser contrarrestada por mecanismos de escape a la función antitumoral desarrollados por las células tumorales (detalles de estos mecanismos y últimas investigaciones se pueden revisar en las publicaciones de González H y col., 2018 [12]; Kannan GS y col., 2017 [15]; Falco M y col., 2019 [16]; Yoon SR y col., 2015 [17]; y Muenst S y col., 2016 [18]).

La evolución del tumor se verá afectada por la presencia de diferentes subconjuntos de células inflamatorias, como son los TAMs y los TANs que, dependiendo de la intercomunicación inmunitaria con otras células inmunes asociadas a tumores y la influencia de múltiples señales microambientales, se polarizan hacia distintos fenotipos, unos con actividades antitumorales y otros con acciones protumorales que favorecen el crecimiento y la progresión neoplásica. Existen diversas publicaciones disponibles para revisar en detalle los elementos que determinan estas funciones, los mecanismos involucrados y su impacto. [12, 18, 19, 20, 21]

Las MDSCs, una población heterogénea de células mieloides inmaduras (precursores de granulocitos, macrófagos o células dendríticas, derivadas de células progenitoras mieloides de médula ósea), están también implicadas en la inflamación crónica y la progresión tumoral, las cuales junto a otras células estromales de la TME (fibroblastos asociados al cáncer, TAMs y TANs), provocan que el tejido maligno quede protegido del ataque inmunológico de las células T. [22]

Los estudios confirman el papel vital que tienen las células dendríticas (DCs) infiltrantes durante el desarrollo neoplásico, debido a su capacidad para inducir y consolidar la inmunidad adaptativa antitumoral, y provocar potentes respuestas citotóxicas mediante la activación de células NKs. Pese a este rol, el TME puede alterar el reclutamiento y funcionamiento de las DCs, reprogramándolas hacia un fenotipo inmunosupresor/tolerogénico y proangiogénico que conduce a una pobre capacidad para estimular las células T, a la expansión de células Tregs y a la supresión directa de respuestas por inducción de anergia en las células T. (Para conocer mayores antecedentes, mecanismos y los mediadores que influyen las actividades antitumorales y protumorales de las DCs, dirigirse a las revisiones de González H y col., 2019 [12]; Muenst S y col., 2016 [18]; Hansen M y Andersen MH, 2016 [23])

Otras células, como las células B infiltrantes de tumores (TIBs), poseen un rol aún poco comprendido. Parecen participar como inhibidores o promotores tumorales, o incluso como reguladores de la inmunidad antitumoral (células B reguladoras o Bregs). Dependiendo de la influencia de factores del TME que inducen su diferenciación hacia diversos subtipos, las TIBs actúan sobre otras células a través de la secreción de citocinas o mediante el depósito de inmunoglobulinas. (Mayores detalles y los avances más recientes sobre esta compleja relación entre las células B y los tumores pueden revisarse en las publicaciones de González H y col., 2019 [12] y Guo FF y Cui JW, 2019 [24], y referencias allí encontradas)

Los linfocitos T son el segundo tipo de célula inmunitaria más frecuente encontrada en los tumores humanos luego de los TAMs, y se estudian ampliamente en diversos tipos de cáncer. Siempre han sido considerados los principales participantes en la inmunidad antitumoral y por ello la investigación se ha concentrado en ellos. Dado que los linfocitos T son centrales para el desarrollo de esta tesis, es que le dedicaremos una sección completa para analizarlos en detalle (ver ítem 1.4).

1.3.2. Componentes solubles

Como se mencionó anteriormente, varios mediadores inflamatorios son liberados por células inmunes en la TME y por células tumorales, y corresponden a factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas, entre otros, que pueden tener una actividad antitumoral o protumoral dependiendo del contexto del TME.

Dentro de los mediadores que pueden cumplir con un rol antitumoral se encuentran las quimiocinas, al ser capaces de reclutar a células inmunes que previenen la progresión del cáncer. Así, las quimiocinas CXCL8, CXCL1, CXCL2 y CXCL3 reclutan neutrófilos fenotípicos N1, CXCL9 y CXCL10 actúan sobre los linfocitos T *helper* 1, CCR4 y CCR7 lo hacen sobre las células Tregs, y CCR6 atrae a las células T CD8+. Entre las citocinas con actividad antitumoral destacan la IL-1, que posee la capacidad de activar y dirigir células inmunes innatas y adaptativas para inhibir la progresión tumoral; y

la IL-10, que mejora la proliferación de células B, la producción de anticuerpos y la supervivencia, junto con inhibir el factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) y también la producción de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-12. Adicionalmente, la IL-10 secretada por células Tregs, está involucrada en la inmunosupresión y retrasa o previene la inflamación inducida por cáncer. Un rol antitumoral similar al anterior, lo tiene el TGF- β , el que también posee un efecto supresor de tumores a través de la *up-regulation* de la inhibición de la quinasa dependiente de ciclina (CKI) P21 y la *down-regulation* del protooncogén c-Myc. El IFN- γ también puede ejercer un efecto antitumoral, basado en su capacidad de controlar la apoptosis, el cual es dependiente del estado de diferenciación de las células y de los niveles de los receptores para IFN. La citocina IL-17, siendo principalmente protumoral, actúa en la inmunidad antitumoral a través de la producción de citocinas, promoviendo la actividad de las células T CD4+ y CD8+ y la respuesta inmune. La PGE2 también contribuye a la inmunidad antitumoral al reclutar neutrófilos y monocitos al sitio de la inflamación y, por otro lado, al activar y expandir las células Tregs y MDSCs, puede inhibir el cáncer inducido por inflamación. Los elevados niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) que se generan durante el alto estrés oxidativo por TNF- α , TAMs y TANs, poseen igualmente un rol importante al inhibir la inflamación y la progresión al cáncer. Finalmente, otros de los mediadores solubles claves son las granzimas y la perforina, producidas y liberadas tanto por las células NK como los linfocitos T CD8+, cuyo mecanismo antitumoral radica en mediar la muerte celular por apoptosis de las células cancerosas y de las que se hablará en detalle más adelante. [25]

A medida que las células neoplásicas escapan de la eliminación, una serie de mediadores están implicados en mantener una TME que favorece la supervivencia de las células neoplásicas y la proliferación sostenida. Estos mediadores son liberados por células inmunes e incluyen a citocinas, factores angiogénicos, factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, entre otros; los que en su conjunto impulsan la inestabilidad genómica, proliferación celular, angiogénesis, resistencia a la apoptosis, transición epitelio-mesenquimal, invasión y metástasis. Entre las citocinas son relevantes la IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, IL-13 e IL-17 las que poseen un rol regulador sobre otras citocinas y sobre la expresión de MHC, inducen la liberación de ROS y RNS, y permiten el reclutamiento de linfocitos Tregs, Bregs y de otras células inmunes con funciones supresoras. En particular, IL-10 e IL-1 β poseen actividad inmunosupresora sobre macrófagos y DCs, mientras que IL-17 la tiene sobre células NKs y T, cumpliendo esta última además con otros roles protumorales como fomentar la inflamación crónica y la producción de factores angiogénicos. Los factores de crecimiento y/o supervivencia TGF- β , TNF- α , EGF (factor de crecimiento epitelial) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), si bien también inducen la producción de especies reactivas y de mediadores inflamatorios crónicos, sus principales funciones son favorecer la supervivencia y proliferación tanto de las células inmunes supresoras como de las células tumorales, e inducir la transición epitelio-mesenquimal y la expresión de enzimas de remodelación tisular (metalo-, cisteína y serina proteasas), contribuyendo estos últimos a la invasión y diseminación. Otros de los mediadores que igualmente promueven la

progresión tumoral son los factores angiogénicos VEGF y PGE2, así como los ROS y RNS (cuando son producidos a bajos niveles durante el estrés oxidativo en condiciones inflamatorias) y las metaloproteinasas (MMPs), especialmente MMP-2 y MMP-9. Si bien los mediadores solubles anteriormente mencionados son los más importantes, existe una amplia variedad que incluye factores de crecimiento (como el factor estimulador de colonias 1 o CSF-1), quimiocinas (CCL18, CCL22, CCL17 y CXCL8) y enzimas (ciclooxigenasa 2 o COX-2, catepsina y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa o uPA. [13, 25]

1.4. Células T y cáncer

1.4.1. Descripción

Las indicaciones iniciales sobre las células T vinieron de Claman y colaboradores en 1966, pero fueron Miller y Mitchell, en 1968, quienes describieron por primera vez sus funciones en un trío de artículos donde se demostraba que las células B requerían la colaboración de un tipo de célula diferente, procedente del timo, para inducir una respuesta de anticuerpos. Estas células fueron reconocidas como un tipo celular de soporte y los autores las denominaron "células reactivas al antígeno". A estos hallazgos le continuaron una serie de estudios confirmatorios utilizando muchos tipos de antígenos y sistemas experimentales, y a partir de 1972 el término "células T auxiliares" se empleó ampliamente para describir a aquellas células educadas por el timo que proporcionan ayuda a las células B [26]. Esto condujo a investigar numerosos fenómenos inmunológicos y a determinar la contribución de otros tipos celulares. Así, en 1975, se estableció la separación fenotípica y funcional de las células T CD8+ y CD4+, lo que motivó por años una ardua investigación para comprender cómo los linfocitos T CD8+ reconocen específicamente el antígeno extraño. Asombrosos frutos se obtuvieron en el período comprendido desde principios hasta mediados de los noventa, donde hubo importantes avances relacionados con los roles, desarrollo, diferenciación, activación y memoria inmunológica tanto de las células T CD4+ y CD8+, lo que marcó el comienzo de una nueva era de comprensión de las células T. En la década del 2000, destacaron los estudios que contribuyeron a entender los eventos que acompañan a la diferenciación de células T *naïve* en células T efectoras activadas y en células T de memoria autorrenovables. Además, varias investigaciones en este período proporcionaron información sobre la complejidad fenotípica y el surgimiento de subpoblaciones de células T. En los últimos años, los esfuerzos han estado focalizados en dilucidar la señalización de las células T y estudiar modulaciones farmacológicas que permitan controlar las respuestas inmunes, específicamente con el fin de preparar el sistema inmunológico contra tumores y para eliminar las respuestas no deseadas [27].

Los linfocitos T se originan a partir de progenitores de la médula ósea que migran al timo para su maduración, selección y posterior exportación a la periferia. Los

progenitores de la médula ósea carecen de expresión de correceptores CD4+ y CD8+, y al llegar al timo se someten a un reordenamiento del receptor de células T (TCR) para generar timocitos CD4+ CD8+ doble positivos. Estas células son seleccionadas y los timocitos simple positivos CD4+ o CD8+ son liberados a la periferia como células T vírgenes o *naïve* maduras, que circulan entre órganos linfoides secundarios (SLOs) como el bazo y ganglios linfáticos. Después del encuentro con células presentadoras de antígeno (APCs) que le presentan su antígeno afín, las células T *naïve* se estimulan y se diferencian en un gran número de células efectoras que migran a tejidos inflamados para combatir infecciones o tumores. Una vez aclarado el antígeno, hasta el 90-95% de las efectoras sufren apoptosis, mientras que una pequeña proporción sobrevive, dando lugar a células T de memoria que persisten como subpoblaciones heterogéneas a largo plazo y que son capaces de volver a expandirse y responder con mayor rapidez y eficacia en un segundo encuentro con el antígeno. [28, 29]

Las células T pueblan prácticamente todos los órganos y tejidos del cuerpo, incluido el tejido linfoide primario y secundario, las mucosas y los sitios de barrera, los órganos exocrinos, la grasa e incluso el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, la mayoría de las células T en el cuerpo humano se encuentra dentro de los tejidos linfoides (médula ósea, bazo, amígdalas y ganglios linfáticos) con un gran número también presente en sitios mucosos (pulmones, intestino delgado y grueso) y piel, estimando que un 2 a 3% del total de células T presentes en el cuerpo se encuentra en sangre periférica [28]. En tanto, el porcentaje de células T con respecto al total de linfocitos en sangre periférica alcanza los 65,3–79,9% [30].

Las células T comprenden tres estados funcionales diferentes: i) células T *naïve*, que tienen la capacidad de responder a nuevos antígenos, ii) células T efectoras, que son clave para direccionar la respuesta inmune y ejecutar las funciones inmunológicas, y iii) células T de memoria, que derivan de la activación previa de antígenos seguido de un retorno al estado de reposo o inactivación (*resting*), mantienen la inmunidad a largo plazo al tener la capacidad de persistir en ausencia de antígeno y permanecer preparadas para responder nuevamente y con mayor intensidad a una reexposición al antígeno que las estimuló. Si bien el compartimento de células T *naïve* es bastante homogéneo, las células T efectoras y de memoria son muy diversas, y comprenden decenas de subpoblaciones con diferentes grados de diferenciación y capacidad multifuncional, características moleculares y localización corporal. Como se ha mencionado, las células T *naïve* que salen del timo pueden ser CD4+ (expresan la glicoproteína CD4 y se conocen como células T colaboradoras o *helper*) o CD8+ (expresan la glicoproteína CD8 en su superficie y se denominan células T citotóxicas). Las células CD4+ y, en menor medida, también las células T CD8+, pueden diferenciarse en varias subpoblaciones, lo que depende de mediadores solubles como citoquinas y metabolitos que estén presentes en el entorno local. Las células CD4+ *naïve* se diferencian en las subpoblaciones: T *helper* 1 (Th1), Th2, Th9, Th17, Th22, linfocitos T *helper* foliculares (Tfh), células T reguladoras (Tregs), células T reguladoras de tipo 1 (Tr1), células T *stem* de memoria (T_{SCM}), células T de memoria central (T_{CM}) y células T de memoria efectoras (T_{EM}). Las células T CD8+ *naïve*

se diferencian en las subpoblaciones: T_{SCM} , T_{CM} , T_{EM} , y células T efectoras (T_{TE}). [29, 31]

Las subpoblaciones de células T difieren en sus marcadores extracelulares, intracelulares, epigenéticos y genéticos, factores de transcripción y rutas metabólicas. El detalle de la identificación fenotípica de estas subpoblaciones es revisado en la publicación de Brummelman J y col., 2018 [29], mientras que sus características funcionales se analizarán a grandes rasgos en el próximo ítem. A continuación se presenta una clasificación fenotípica simplificada de las subpoblaciones de células T, basada en marcadores expresados en la superficie celular e intracelulares:

Subpoblaciones de células T			Marcadores
Células T <i>naïve</i> (TN)			CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CCR7 ⁺ CD62L ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD127 ⁺
Células T de memoria	Células T <i>stem</i> de memoria (T _{SCM})		CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CCR7 ⁺ CD62L ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD127 ⁺ CD95 ⁺ CD122 ⁺ LFA-3 ⁺
	Células T de memoria central (T _{CM})		CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ CD62L ⁺ CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD127 ⁺ CD95 ⁺ CD122 ⁺
	Células T de memoria efectoras (T _{EM})		CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ CCR7 ⁻ CD62L ⁻ CD27L ^{low} CD28 ^{low} CD127 ^{low} CD95 ⁺ CD122 ⁺
Células T efectoras	Células T efectoras terminales (T _{TE})		CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CCR7 ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁻ CD127 ⁻ CD95 ⁺ CD122 ⁺
	Células T CD4 ⁺ efectoras	Células T helper 1 (Th1)	CCR1 ⁺ CCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ IL-12Rβ2 ⁺ IL-17Ra ⁺ IL-18Ra ⁺ IL-27Ra/WSX-1 ⁺ IFN-γR1/CD119 ⁺ IFN-γR2 ⁺ STAT1 ⁺ STAT4 ⁺ T-bet ⁺
		Células T helper 2 (Th2)	CRTh2 ⁺ CCR3 ⁺ CCR4 ⁺ CCR8 ⁺ CCR6 ⁻ CCR10 ⁻ CXCR4 ⁺ IL-4Ra ⁺ IL-17RB ⁺ GATA-3 ⁺ ST2/IL-33R ⁺ TSLPR ⁺
		Células T helper 17 (Th17)	CCR6 ⁺ IL-23R ⁺ CCR4 ⁺ CD161 ⁺ IL-1R ⁺ IL-6Ra ⁺ IL-21R ⁺ IL-23R ⁺ TGF-βRII ⁺ Batf ⁺ IRF4 ⁺ RORa ⁺ STAT3 ⁺
		Células T helper 22 (Th22)	CCR4 ⁺ CCR6 ⁺ CCR10 ⁺ IL-6Ra ⁺ TGF-βRII ⁺ TNFR1 ⁺ AHR ⁺ STAT3 ⁺ Batf ⁺
		Células T helper 9 (Th9)	IL-4Ra ⁺ IL-17RB ⁺ TGF-βRII ⁺ PU.1 ⁺ IRF4 ⁺ IRF8 ⁺ Batf ⁺
		Células T helper 1 no clásicas (Th1*)	CXCR3 ⁺ CCR4 ⁻ CCR6 ⁺ CD161 ⁺ IL-1R ⁺ T-bet ⁺ RORYt ⁺
		Células T helper foliculares (Thf)	CXCR4 ⁺ CXCR5 ⁺ CXCL13 ⁺ BTLA ⁺ CD40L ⁺ CD57/B3GAT1 ⁺ IL-6Ra ⁺ IL-21R ⁺ ICOS ⁺ PD-1 ⁺ SLAMF3/CD229 ⁺ SLAMF5/CD84 ⁺ SLAMF6/NTB-A ⁺ SLAM/CD150 ⁺ Neprilysin/CD10 ⁺ OX40 ⁺ Bcl6 ⁺ c-Maf ⁺ STAT3 ⁺
Células T reguladoras (Tregs)	Células T reguladoras en reposo (rTregs)		CD25/IL-2Ra ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ CTLA4 ⁺ CD127/IL-7Ra ^{low} GITR ⁺ TNFR2/CD120B ⁺ FoxP3 ^{low}
	Células T reguladoras efectoras (Treg _{EFF})		CD25/IL-2Ra ^{+/-} CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ CTLA4 ⁺ CD127/IL-7Ra ^{low} GITR ⁺ TNFR2/CD120B ⁺ FoxP3 ⁺
	Células T reguladoras de memoria efectoras (Treg _{EM})		CD25/IL-2Ra ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ CTLA4 ⁺ CD127/IL-7Ra ⁺ TNFR2/CD120B ⁺ HLA-DR ⁺ PD-1 ⁺ ICOS ⁺ GITR ⁺ FoxP3 ⁺
	Células T reguladoras tipo 1 (Tr1)		LAG-3 ⁺ CD49b ⁺ CTLA-4 ⁺ CD25/IL-2Ra ^{low} CD127/IL-7Ra ^{low} HLA-DR ⁺ PD-1 ⁺ CD226 ⁺ CD2 ⁺ LFA-1 ⁺ ICOS ⁺ GITR ⁺ Foxp3 ⁺
Linfocitos T citotóxicos CD4 ⁺ (CTL CD4 ⁺)			CD107a ⁺ CD107b ⁺ KLRC1 ⁺ KLRK1 ⁺ CRTAM ⁺ CD27 ^{low} CD28 ^{low}

Tabla 1.1: Subpoblaciones de células T.

1.4.2. Roles de las células T en cáncer

Las células T son componentes del sistema inmunológico adaptativo que actúan como orquestadores, efectores y reguladores de las respuestas inmunes. Según el contexto inmunológico, las células T pueden adquirir fenotipos cuya actividad tiene consecuencias inflamatorias o antiinflamatorias directas, y sus roles en la inmunidad son dependientes tanto de la etapa de la vida, como de compartimentos anatómicos específicos. [28]

Las células T *naïve*, son células T inactivas que todavía no han estado en contacto con el antígeno desde que salieron del timo y que recirculan continuamente entre el torrente sanguíneo y los SLOs, cumpliendo el importante rol de encontrar, interactuar y montar respuestas a nuevos antígenos. Funcionalmente, las células T se consideran *naïve* hasta que encuentran su antígeno análogo, tras lo cual proliferan y se diferencian en células T efectoras y de memoria, capaces de migrar a los distintos tejidos para patrullar antígenos. La presencia y acción de estas células en neoplasias ha sido documentada en estudios que han demostrado que los tumores son sitios particularmente atractivos para el cebado de las células T *naïve*, al constituir un gran depósito de antígenos y al contener múltiples tipos de células presentadoras de esos antígenos; además, se ha visto que existe una presentación de antígenos tumorales por parte de las DCs en los ganglios linfáticos que drenan el tumor, así como también una presentación directa por células tumorales que han migrado a tales ganglios. [32]

Las células T de memoria se caracterizan por haber estado en contacto con el antígeno al menos una vez, lo que condujo a una expansión y activación seguido de un retorno al estado de reposo o inactivación (*resting*). Estas células tienen la capacidad para acceder tanto a los SLOs como a tejidos periféricos y para persistir en ausencia de antígeno, lo que les permite permanecer preparadas para responder nuevamente y con mayor intensidad a una reexposición al antígeno que las estimuló [31]. Constituidas por múltiples subpoblaciones, las células T *stem* de memoria (T_{SCM}), caracterizadas por ser tipo *naïve* pero funcionan como células de memoria, son de particular interés para la inmunoterapia del cáncer. Debido a su potencia aumentada y a su capacidad para generar potentes efectores después del reconocimiento de antígenos, estas células han demostrado que pueden generar respuestas inmunes a largo plazo para la vigilancia antitumoral [29].

Las células T efectoras, originadas a partir de la diferenciación de los linfocitos T *naïve* en los SLO y caracterizadas por presentar una vida corta, adquieren la capacidad de migrar selectivamente a diversas localizaciones para cumplir con funciones T-dependientes de la respuesta inmunitaria adaptativa, la que se desarrolla de manera diferente según la subpoblación y su linaje CD4+ o CD8+. Así, como se presenta a continuación, mientras las células T CD4+ actúan principalmente mediante la generación robusta de citocinas y quimiocinas, las células T CD8+ centran fundamentalmente su función en la eliminación de patógenos intracelulares e incluso el cáncer a través de su capacidad citolítica.

Las células T CD4+ reconocen al antígeno específico cuando es presentado por las APCs locales (DCs, macrófagos y monocitos) asociado al complejo MHC-II y tras ello producen sus citocinas efectoras apropiadas. Los distintos conjuntos de citocinas y la fuerza de señalización de TCR promueven el proceso de diferenciación de las células T *naïve* CD4+ hacia las diferentes subpoblaciones efectoras T *helper* o reguladoras. Sus funciones pro o antiinflamatorias, de supervivencia o protectoras, están determinadas por el patrón de citocinas que producen, permitiéndoles desencadenar una respuesta

inmune diferente y adaptada a cada situación. [31]

Diversas subpoblaciones efectoras destacan en sus roles en neoplasias. Es el caso de las células T *helper* 1 (Th1), caracterizadas por la secreción de IL-2, TNF e IFN- γ , juegan un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares como bacterias y virus, así como en la respuesta inmune frente a neoplasias. En esta última, tienen la capacidad de activar y reclutar a otras células efectoras específicas de antígenos tumorales y a células del sistema inmune innato, incluyendo a las APCs, pudiendo también destruir directamente a las células cancerosas mediante la liberación de citocinas que activan los receptores de muerte de su superficie celular; todo lo cual ha motivado un creciente interés para lograr la modulación específica de la respuesta de las células Th1 contra antígenos tumorales y así conseguir terapias inmunes más eficaces. También las células Th2, a través de la producción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, cumplen un rol fundamental en la protección contra los parásitos extracelulares, sin embargo, también se hallan involucradas en reacciones alérgicas y en la promoción del crecimiento tumoral mediado por la inflamación tipo Th2. Las células Th9, caracterizadas por la expresión de altos niveles de IL-9, han mostrado que facilitan las respuestas inmunes antitumorales tanto innatas como adaptativas. Las células Th17 frente a neoplasias muestran una actividad que se presenta como una espada de doble filo, dado que son capaces de aumentar la progresión tumoral activando la angiogénesis y las actividades inmunosupresoras, en tanto que también pueden mediar en las respuestas antitumorales mediante el reclutamiento de células inmunitarias en los tumores, estimulando las células T efectoras CD8⁺ o, sorprendentemente, alterando el fenotipo Th1 y produciendo IFN- γ . Otras subpoblaciones, como las células Th22, tienen un papel aún poco claro en cáncer y sólo recientemente han aparecido estudios que han indicado la función crucial que tienen estas células en la tumorigénesis de varias neoplasias. Algo similar ocurre con las células T *helper* foliculares (Tfh), que aún no se ha dilucidado claramente su papel en la inmunidad tumoral, aunque su presencia en los tumores se correlaciona con una mayor supervivencia y una reducción en el crecimiento neoplásico en los pacientes con melanoma, demostrándose que promueven la expansión y/o actividad de los CTLs intratumorales. [29, 31, 33, 34, 35, 36, 37]

Las células T reguladoras son responsables de suprimir el cebado, la activación y la citotoxicidad de otras células inmunes efectoras, como células Th1, CTL, macrófagos, células NK y neutrófilos. En cáncer, las células Tregs infiltradas en el TME están implicadas en el desarrollo y la progresión tumoral al inhibir la inmunidad antitumoral mediante una serie de mecanismos inmunosupresores que involucran el secuestro de IL-2, la secreción de citocinas inhibitorias, la citólisis directa de células T efectoras, la alteración metabólica y la modulación de las DCs. [38, 39]

En las células T CD8⁺, las células T *naïve* CD8⁺ se diferencian dando origen a los linfocitos T citotóxicos, lo que sucede en los SLOs tras encontrarse con las APCs que presentan antígenos en el contexto de una coestimulación apropiada y ayuda de citocinas como la IL-2, IFN- α/β , IL-12 e IL-15, o por reprogramación de células T de memoria.

En las respuestas inmunitarias adaptativas, los CTLs son el principal mecanismo para destruir a las células infectadas con patógenos intracelulares y también se consideran las células efectoras anticancerígenas más importantes. Esta destrucción celular sucede luego que los CTLs reconocen específicamente a células diana que presentan el complejo MHC-I asociado al mismo antígeno que desencadenó la proliferación y diferenciación de los linfocitos T *naïve* CD8+. Los CTLs tienen la capacidad de inducir directamente la activación de las caspasas con la consiguiente muerte celular por apoptosis, a través de tres mecanismos principales: i) la liberación de las granzimas A, B y C (serina proteasas que en el citoplasma de la célula diana escinden las caspasas) y de la perforina (proteína capaz de formar poros en la membrana facilitando de este modo la liberación de granzimas en el citosol), ii) las interacciones entre las moléculas de la membrana del CTL (ligando de Fas o FasL) y de las células diana (receptor Fas), y iii) la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Así, estas células T CD8+, que reconocen antígenos presentados por las moléculas del MHC-I de prácticamente todas las células del cuerpo, pueden también detectar antígenos asociados a tumores y destruir células cancerosas tras un encuentro competente [13]. Por otro lado, al igual que las células Th1, los CTLs generan cantidades importantes de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF- α , las que también podrían conducir a la apoptosis de células diana dependiente de caspasa, con su función inmunorreguladora en la mayoría de los casos. La infección primaria resulta en la activación y proliferación de las células T *naïve* CD8+ dando origen a clones de CTLs específicos de antígeno diferenciados en dos linajes: i) las células T efectoras terminales (T_{TE}), que se caracterizan por poseer potentes funciones efectoras y ser poco proliferativas, en su mayoría mueren (90–95%) una vez eliminadas las células diana, y ii) las células T de memoria (5-10%), una diversidad de células que sobreviven a largo plazo en el anfitrión y lo protegen rápidamente en caso de reinfección, tienen la capacidad de reprogramarse para generar CTLs [13, 40].

Existen otras subpoblaciones de células T, como los CTLs CD4+, que de modo similar a los CTLs CD8+, cumplen un papel importante en la inmunidad antitumoral [29]. En tanto, los estudios sobre los linfocitos T $\gamma\delta$ y T NK han demostrado que pueden desempeñar roles duales en cáncer, promoviendo el desarrollo de neoplasias por un lado, mientras participan en la inmunidad antitumoral por otro. Más recientemente, las investigaciones sobre sus funciones han puesto en evidencia su atractivo para el desarrollo de nuevas terapias celulares dirigidas contra el cáncer [41, 42].

Para que pueda montar una respuesta inmunitaria, las células T *naïve* y de memoria necesitan activarse, dando lugar a células T efectoras con capacidad para eliminar patógenos o células tumorales. Para llevar a cabo esta activación, las células T requieren primero generar por recombinación genética su TCR, un proceso que ocurre durante su desarrollo en el timo y que otorga especificidad, dando como resultado células T *naïve* en reposo capaces de migrar a través de los SLOs y la circulación periférica, pero aún incapaces de producir una respuesta contra un antígeno. La activación de la célula T *naïve* implica interacciones coordinadas entre una serie de moléculas en la célula T y la APC que procesa y presenta el péptido antigénico, un proceso conocido como sinapsis

inmunológica, donde el TCR actúa como mediador principal al reconocer a su antígeno afín unido no covalentemente a una molécula del MHC de clase I o clase II apropiada. [43, 44]

Dado que la simple estimulación de una célula T con su antígeno afín solo no conduce a la activación (se produce un estado de hiporrespuesta conocido como anergia), para que ésta sea completa es necesario contar con interacciones célula-célula firmes y señalizaciones intracelulares adicionales. De esta manera, las interacciones TCR/péptido/MHC requieren del reclutamiento de otras moléculas coestimuladoras y/o de adhesión (detalladas en la publicación de Strohl y Naso, 2019 y en el párrafo siguiente), que al agruparse forman una gran estructura multimolecular conocida como complejo de activación supramolecular (SMAC) [45] que provoca una señalización *downstream* iniciada por la unión del TCR. Este conjunto de señales conduce colectivamente a un programa transcripcional que da como resultado la producción/secreción robusta de IL-2, un factor autocrino y paracrino que estimula la proliferación de las células T específicas frente al antígeno (expansión clonal), seguido de la diferenciación de las células activadas a células efectoras y de memoria [43].

Para promover estas interacciones célula-célula fuertes y más prolongadas, juegan roles claves los correceptores CD4 o CD8 (según el tipo de célula T), que se encuentran asociados al TCR y se unen al MHC (clase I para CD8 y clase II para CD4) para estabilizar aún más esta interacción entre la célula T y la APC. Una función similar cumple la molécula LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) [43, 45]. En tanto, las señales derivadas de moléculas coestimuladoras tales como CD27 y CD28 son cruciales, principalmente esta última vía que es considerada como la “segunda señal” clave para la activación de la célula T. Tras la activación inicial, se induce la expresión de importantes moléculas de superficie que participan en las respuestas funcionales de estos linfocitos, como son CD69 (permite que las células T activadas se retengan en los órganos linfáticos hasta recibir las señales que inician su proliferación y diferenciación en células efectoras y de memoria), CD25 o IL-2R α (cadena alfa del receptor de interleucina-2) (capacita a las células T activadas para responder a IL-2) y CD40L (el ligando para CD40 que permite a las células T activadas cooperar con macrófagos y linfocitos B, además de activar a las DCs). Además, tras la activación, las células T reducen la expresión de moléculas como la selectina L y el receptor para quimiocinas CCR7, que las conducen a los órganos linfáticos, y aumentan la expresión de moléculas que participan en su migración a los lugares periféricos de infección y lesión tisular (como las integrinas LFA-1 y $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)) [43, 44]. Para finalizar, se ha demostrado que existen otras señales, como las conducidas por citocinas inflamatorias, que tendrían un papel como mediadores en la diferenciación de la célula T estimulada hacia un efector apropiado, así como también, la de los miembros de la superfamilia de receptores de TNF (CD27, OX-40, 4-1BB y CD30), que al interactuar con su ligando apropiado en las APCs (CD70, OX-40L, 4-1BBL y CD30L, respectivamente), pueden promover la supervivencia de las células en proliferación, durante su diferenciación y como memoria [43].

Junto a las moléculas coestimuladoras y/o de adhesión, las células T activadas también expresan una serie de receptores inhibidores que ayudan a afinar la respuesta final y a adaptarse al medio inflamatorio donde fue estimulada, ya sea limitando la unión de moléculas coestimuladoras como su señalización. Entre estos receptores destacan el CTLA-4, un inhibidor de la activación de las células T y un regulador de la respuesta, capaz de amortiguar la señalización descendente del TCR y CD28, así como también otros receptores inhibidores que incluyen PD-1 (*programmed cell death protein-1*), LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*) y VISTA (*V-domain Ig suppressor of T cell activation*), cuyo bloqueo de sus funciones usando anticuerpos monoclonales se ha utilizado con fines clínicos para aumentar la inmunidad contra varios cánceres. [43]

Como ya se ha mencionado, la activación de la célula T resulta en la producción de IL-2, un factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación para los linfocitos T. Su producción es rápida y transitoria (comienza a las 2-3 horas de la exposición al antígeno, con un máximo a las 8 a 12 horas aproximadamente y una declinación a las 24 horas) y su función principal es mediar, junto a otras señales procedentes de receptores y coestimuladores, la proliferación o expansión clonal y la diferenciación a células efectoras. La expansión clonal permite generar un gran número de células T CD4+ y CD8+ a partir de una pequeña reserva de células T *naïve* antígeno-específicas, las que se diferencian posibilitando su rápida migración de los SLOs a diversos sitios para eliminar patógenos y células tumorales, en un proceso mediado por la expresión de moléculas de adhesión y de quimiocinas adecuadas. Si bien la progenie de células estimuladas se diferencia en gran parte en células efectoras, la mayoría muere rápidamente a medida que eliminan el antígeno y una proporción de células T de memoria permanece en un número que es 10 a 100 veces más alto que el de las células *naïve* que estaban presentes antes del encuentro con el antígeno, mejorando el patrullaje y la vigilancia del huésped. Concomitantemente esto sucede, se establece una cantidad creciente de células inmunorreguladoras y citocinas destinadas a restaurar la homeostasis normal del tejido. [28, 44]

En la respuesta secundaria, la presencia *in situ* de células T de memoria permite responder inmediatamente ante la presentación de cantidades mínimas de antígeno, lo que se ve favorecido por la acción de quimiocinas y citocinas efectoras liberadas por estas células que atraen muchas células inmunes innatas y efectoras. Así también, las células de memoria son más sensibles a la estimulación de antígenos a través de su TCR y son algo menos dependientes de moléculas coestimuladoras, lo que también contribuye a permitir su respuesta productiva. [43]

Lo anteriormente presentado es una descripción de la respuesta que puede suceder cuando todo funciona exactamente como debiera, sin incorporar todas las posibles permutaciones que se generan en el mundo real y que puedan influir en ella.

1.4.3. Respuesta de las células T en cáncer

Las células T son componentes del sistema inmunológico adaptativo que actúan como orquestadores, efectores y reguladores de las respuestas inmunes. Como el segundo más frecuente tipo de célula inmunitaria encontrada en los tumores humanos después de los TAMs, las células T se estudian ampliamente en diversos tipos de cáncer, dado el papel fundamental que juegan tanto en la inmunomodulación natural como en la inducida terapéuticamente. Para que la inmunovigilancia del cáncer sea eficaz, se requiere que los antígenos específicos de tumores (TSAs) (expresados exclusivamente en células tumorales y codificados por genes mutados) y los antígenos asociados a tumores (TAAs) (compartidos por células normales y tumorales), sean capaces de estimular la expansión de las células T. En el caso de los TSAs, los estudios han sugerido que el reconocimiento de las células T es tan específico que pueden distinguir péptidos con cambios de un solo aminoácido y de esta forma los TILs son capaces de dirigirse focalizadamente a estos antígenos. Esto también ha sido apoyado por otras investigaciones que muestran una asociación entre el aumento de epítomos con mutaciones y una mayor supervivencia del paciente. Con respecto a los TAAs, estudios en ciertos cánceres han demostrado que el sistema inmunológico puede reconocer TAAs, debido a una sobreabundancia de antígeno o a su presentación mejorada producto de la muerte de células tumorales, generando células T y anticuerpos específicos contra ellos. [18]

Las células T *naïve* son células T inactivas que salen del timo y que recirculan en el torrente sanguíneo y los SLOs hasta que encuentran a su antígeno análogo, tras lo cual proliferan y se diferencian en células T efectoras y de memoria, capaces de migrar a los distintos tejidos para patrullar antígenos. Estudios han demostrado que durante las primeras etapas de iniciación del tumor, las células T *naïve* se cebarán en los sitios neoplásicos, por presentación directa de las células tumorales, o en los ganglios linfáticos, por parte de APCs, destacando en este último caso la acción de DCs. En esta presentación antigénica, las DCs son extremadamente eficientes para inducir respuestas de células T, luego de presentarles antígenos proteicos en el contexto de moléculas MHC de clase I (a células T CD8+) y de clase II (a células T CD4+), o antígenos lipídicos en el contexto de moléculas CD1 (a células T NK). A partir de ahí, las células T se activan y migran al TME donde montan una respuesta inmune efectora contra las células cancerosas inmunogénicas. [12, 13, 32]

Las células T efectoras, originadas a partir de la diferenciación de los linfocitos T *naïve* en los SLOs y caracterizadas por presentar una vida corta, adquieren la capacidad de migrar selectivamente a diversas localizaciones para cumplir sus funciones T-dependientes de la respuesta inmune adaptativa, la que se desarrolla de manera diferente según la subpoblación y su linaje CD4+ o CD8+. Así, como se presenta a continuación, mientras las células T CD4+ actúan principalmente mediante la generación robusta de citocinas y quimiocinas, las células T CD8+ centran fundamentalmente su función en la eliminación de patógenos intracelulares y células cancerosas a través de su capacidad citolítica.

Como se ha mencionado, los linfocitos T CD8+ se consideran las células efectoras anticancerígenas más importantes. Los CTLs tienen la capacidad de reconocer TAAs presentados por las moléculas del MHC-I en las células cancerosas y destruirlas mediante la citólisis directa o a través de la secreción de citocinas efectoras, pudiendo prevenir así el crecimiento de tumores locales. También se ha demostrado que los CTLs promueven la actividad citotóxica de los macrófagos y pueden inducir la *up-regulation* del procesamiento de antígenos y la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II en macrófagos y DCs [13]. En consecuencia, una gran infiltración de células T CD8+ efectoras se ha asociado con un pronóstico favorable en melanoma y en otros cánceres como de mama, pulmón, ovario, colorrectal, riñón, próstata y estómago [13, 18]. Sin embargo, al llegar a los sitios tumorales, las células T CD8+ deben enfrentar numerosas barreras y su potencia es regulada por el equilibrio entre las señales coestimuladoras y coinhibidoras procedentes de los puntos de control inmunológico intrínsecos (CD28-CTLA-4, PD1-PD-L1 e ILT), de los puntos de control extrínsecos (como las células Tregs o las células mieloides), de una TME corrompida con inflamación protumor, de una pérdida de antígeno y evasión inmune de objetivos tumorales, y de alteraciones específicas de tejido [13].

Las células T CD4+ se consideraron por mucho tiempo como un actor secundario en la respuesta contra el cáncer. Las células T *naïve* CD4+, tras reconocer antígenos tumorales específicos presentados por las APCs locales asociados al complejo MHC-II, producen un patrón de citocinas, las que junto a la fuerza de señalización del TCR, promueven la diferenciación hacia las diferentes subpoblaciones efectoras T *helper* o reguladoras, capaces de desencadenar respuestas inmunes diferentes y adaptadas a cada situación [31]. A continuación se revisan a groso modo las células T efectoras y reguladoras del linaje CD4+ que con mayor preponderancia actúan en la erradicación de tumores y como mediadores de la inmunidad antitumoral a través de sus citocinas:

-Células T efectoras:

Las células Th1 y sus citocinas, clásicamente importantes en la protección contra patógenos intracelulares, han demostrado que también ejercen fuertes efectos antitumorales y se les correlaciona con un pronóstico favorable. Poseen la capacidad de activar y reclutar a otras células efectoras específicas y a células del sistema inmune innato, así como también pueden destruir directamente a las células neoplásicas. De este modo, se ha visto que en cáncer de mama, colorrectal y melanoma, citocinas como IFN- γ pueden inhibir el crecimiento tumoral al inducir la expresión de MHC-I y MHC-II en las células cancerosas y en las APCs, y al inducir la regresión de la vasculatura del tumor. También se ha informado que las células Th1 adquieren características citotóxicas marcadas por la liberación de citocinas que activan los receptores de muerte de las células cancerosas y por la expresión de granzima B en el TME en un modo parecido a los CTLs CD8+. Todo esto sustenta el creciente interés para lograr modular las respuestas específicas de las células Th1 contra antígenos tumorales y así conseguir

terapias inmunes más eficaces. [12, 46]

Las células Th9 han mostrado que facilitan las respuestas inmunes antitumorales tanto innatas como adaptativas. A través de sus citocinas IL-9 e IL-22 pueden activar a los mastocitos y células NKs, reclutar a DCs y CTLs mediante CCL20/CCR6, mejorar la producción de INF- γ y la actividad citolítica de los CTLs; en tanto que IL-3 es capaz de promover la supervivencia de las DCs, induciendo respuestas antitumorales más potentes. Adicionalmente, se ha visto que las células Th9 pueden destruir directamente células cancerosas en melanoma mediante la secreción de granzima B y C. Sin embargo, al actuar como factor de crecimiento de células T, la citocina IL-9 ha mostrado poseer un papel tumorigénico y de fomento del crecimiento de células neoplásicas en cánceres hematológicos. [46]

Las células Th17 se presentan ampliamente en neoplasias (linfoma, mieloma, cánceres de pulmón, colon, estómago, ovario, páncreas, próstata, cáncer hepatocelular y melanoma) y muestran un rol dual en la inmunidad tumoral. Por un lado, se ha demostrado que, a través de su citocina IL-17, pueden aumentar la progresión tumoral al inhibir la apoptosis de las células tumorales, activar la angiogénesis y las respuestas inmunosupresoras, y promover la metástasis. Contradictoriamente, las células Th17 también han evidenciado propiedades tumoricidas en algunos cánceres, a través de la transdiferenciación de estas células a un fenotipo tipo Th1 capaz de producir INF- γ y eliminar células tumorales, por el reclutamiento y activación de CTLs accionado por la secreción de IL-2, y mediante la estimulación de células tumorales, epiteliales y estromales para producir citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias que reclutan DCs, células NKs, macrófagos y neutrófilos hacia los tumores para reprimir su progresión. [35, 46]

Los CTLs CD4⁺ poseen un potencial citotóxico directo capaz de destruir células infectadas y transformadas en una forma similar a los CTLs CD8⁺, pero de una manera restringida al MHC-II. Los CTLs CD4⁺ presentes en los TILs de diferentes entornos tumorales muestran una alta expresión de moléculas efectoras citolíticas y de NKG7 (*NK cell granule protein 7*). En cáncer de vejiga se ha observado que pueden destruir directamente a las células tumorales mediante la secreción de perforina y/o granzimas, lo que también se ve favorecido por la expresión de INF- γ y TNF por parte de las mismas células. [29, 46]

Existen otras subpoblaciones de células T efectoras CD4⁺ que se han relacionado con cáncer, sin embargo, los estudios aún no han dilucidado claramente su papel en la inmunidad tumoral. Es el caso de las células Th22, vinculadas en la tumorigénesis de varias neoplasias; las células Thf, correlacionadas con una mayor supervivencia y menor crecimiento neoplásico en melanoma; y los linfocitos T $\gamma\delta$ y TNK, que han demostrado que pueden desempeñar roles duales, ya sea promoviendo el desarrollo neoplásico por un lado, mientras participan en la inmunidad antitumoral por otro. [29, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 41, 42]

-Células T reguladoras:

Las células T reguladoras son responsables de suprimir el cebado, la activación y la citotoxicidad de otras células inmunes efectoras (células Th1, CTLs, macrófagos, células NK y neutrófilos). La proporción de Tregs en sangre periférica está incrementada significativamente en pacientes en una amplia gama de neoplasias y un aumento de estas células infiltradas en el TME está implicado con el desarrollo y progresión tumoral y se ha asociado con mal pronóstico en cáncer de ovario, mama y gástrico [18]. Los mecanismos que inhiben la inmunidad antitumoral involucran el secuestro de IL-2, la secreción de citocinas inhibitorias (IL-10 y TGF- β), la citólisis directa de células T efectoras, la alteración metabólica y la modulación de las DCs [13, 18, 33, 39, 46]. Pese a que la evidencia apunta a un rol protumoral de las células Tregs, en ciertas neoplasias (cáncer colorrectal y algunos linfomas) se han visto que el aumento de estas células infiltrando tumores está asociado con mejor pronóstico. Al respecto, estudios han demostrado que el agotamiento específico de Tregs da como resultado la muerte de células tumorales y un aumento en la producción de INF- γ . Estos hallazgos apoyan la hipótesis que sugiere que la función de las células Tregs en los tumores puede depender del contexto [12, 18].

Como se ha descrito, el progreso o retroceso tumoral dependerá en gran parte de la aptitud inmunitaria de las células T efectoras reactivas al tumor, de las intervenciones inmunitarias y modulaciones, así como de los tipos y estadios de los tumores. Sabemos que las células T son inicialmente muy eficaces para reconocer y destruir células transformadas malignas que expresen antígenos altamente inmunogénicos, sin embargo, a medida que crece el tumor y cambia el TME, esa capacidad se altera y su eficacia para contener el tumor se reduce. Las células cancerosas pueden explotar las propiedades inmunosupresoras de las células T al tiempo que alteran sus funciones efectoras antitumorales, conduciendo a una reducción en su supervivencia, proliferación, citotoxicidad y poder para infiltrar tumores. La presencia de señales inhibitorias procedentes de ciertas citocinas, de mecanismos inmunorreguladores derivados de las células Tregs y la expresión de puntos de control inmunes, conducen a la supresión de las células T y permiten a los tumores malignos escapar del control inmunológico y proliferar. Resulta relevante el papel que juegan las moléculas de puntos de control al actuar como reguladores negativos de la función de las células T, limitando la extensión y duración de las respuestas inmunitarias. Así, la implicancia de los receptores co-inhibidores como CTLA-4 en ciertos cánceres (melanoma, de pulmón, mama, gástrico y colorrectal), así como PD-1 con su correceptor PDL-1 (expresado por otras células inmunes, células mesenquimales, células vasculares y células cancerosas), da como resultado la *down-regulation* de la actividad de las células T, inhibiendo sus funciones antitumorales, tales como la migración y la proliferación, la secreción de mediadores citotóxicos y restringiendo sus capacidades para destruir a las células neoplásicas. [12, 18]

2. La inmunoterapia antitumoral: una herramienta prometedora para el tratamiento del cáncer

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer se ubicó como la segunda causa de muerte más común a nivel mundial (es responsable de una de cada seis muertes) y es una barrera importante para aumentar la esperanza de vida en todos los países del mundo. El Global Cancer Observatory: CANCER TODAY (GLOBOCAN), una plataforma web interactiva desarrollada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), estimó que en el 2020 se produjeron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10 millones de muertes en todo el mundo. En general, la incidencia y la mortalidad por cáncer está creciendo rápidamente en todo el planeta, lo que refleja tanto el envejecimiento y el crecimiento de la población como los cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo de cáncer, varios de los cuales están asociados con el desarrollo socioeconómico. [47]

La terapia contra el cáncer tradicionalmente se ha centrado en cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia endocrina. Sin embargo, estos tratamientos a menudo alcanzan un período refractario que conduce al fracaso terapéutico y los pacientes desarrollan recurrencia de la enfermedad [4]. La intensa búsqueda de un tratamiento eficaz contra el cáncer ha generado una variedad de estrategias basadas en dificultar la capacidad de replicación, crecimiento y señalización de las células cancerosas, mientras que otras han puesto su objetivo en inducir una respuesta inmune antitumoral eficaz [48]. Es, en este último contexto, donde los importantes avances logrados en los últimos 30 años en inmunología tumoral han proporcionado técnicas y conocimientos sobre las señales moleculares, citocinas, receptores inmunorreguladores y procesos fisiopatológicos, que han permitido desarrollar nuevos enfoques en el tratamiento contra el cáncer. Esto ha dado a lugar a estrategias que apuntan a componentes específicos en el TME y al bloqueo de vías inhibitorias, así como a terapias dirigidas y al concepto de oncología de precisión: tratamiento adaptado al paciente individual, con el objetivo de atacar las vulnerabilidades específicas del cáncer, tratando a su vez de reducir las toxicidades y mejorar la calidad de vida de los pacientes [49]. Es así como la inmunoterapia, desde su nacimiento hace más de un siglo en manos de un cirujano de huesos [50], ha ido evolucionando gracias a los numerosos estudios en modelos animales y en pacientes con cáncer que han contribuido a comprender los componentes del sistema inmunitario que son cruciales para la inmunovigilancia y el rechazo tumoral, con el fin de dilucidar cómo, cuándo y por qué fallan en casos de enfermedad neoplásica. Los frutos de estos avances han motivado a las compañías farmacéuticas a desarrollar medicamentos contra el cáncer enfocados en la terapia inmune, permitiendo introducir con éxito varias modalidades en la clínica y convirtiendo a la inmunoterapia en una herramienta prometedora para el tratamiento y cura de por vida de muchos tipos de cáncer [3].

El éxito actual de las inmunoterapias contra el cáncer se basa en el trabajo sobre los antígenos tumorales y las moléculas de señalización co-inhibidoras identificadas hace más de 20 años atrás [51]. Los antígenos tumorales más prometedores se han probado como vacunas, adyuvantes potentes, citocinas inmunoestimuladoras, como objetivos para anticuerpos monoclonales y como objetivos para células T citotóxicas transferidas adoptivamente, tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos [3]. En tanto, los métodos que bloquean las vías inhibitorias y las células inhibidoras en el TME, tales como anticuerpos contra CTLA-4, PD-1 y PD-L1, o quimioterapia de dosis baja, han ayudado a acelerar el avance de la reprogramación y el diseño de células T para obtener una potente inmunidad antitumoral [3, 18].

En lo que respecta a las células inmunes, ya hemos mencionado que algunos subconjuntos, tales como las células T específicas de antígeno, han evidenciado un impresionante potencial clínico y representan una oportunidad para frenar el crecimiento tumoral. Estudios han demostrado la capacidad de respuesta de diversos cánceres a una variedad de inmunoterapias, sugiriendo que los TILs pueden dirigirse específicamente a los TSAs. Así, por ejemplo, los clones CD8+ aislados de las células T_{CM}, persistieron a largo plazo *in vivo* durante la transferencia de células T adoptivas en un modelo de primates no humanos, evidenciando la implicancia de las funciones específicas de ciertos subconjuntos de células T para una inmunoterapia adoptiva eficaz. En el caso del linaje CD4+, si bien se consideran un actor secundario en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer, se ha comprobado que la combinación de subconjuntos CD8+ con subconjuntos CD4+ mejora significativamente la transferencia adoptiva de células T. Se ha podido ver que las células CD4+ apoyan el desarrollo de las funciones de memoria CD8+, demostrando así la importancia de ambos subconjuntos y combinaciones en los ensayos de inmunoterapia. Por otro lado, varias investigaciones han evidenciado los roles diferenciales que poseen las citocinas de los diversos subconjuntos CD4+, como las liberadas por las células Th1 y Th2, capaces de impulsar diferentes tipos de citotoxicidad generadas por las células CART de segunda generación que contienen CD28. También, células CART diseñadas para producir IL-12, por acción de esta citocina, aumentan la actividad anticancerígena mediante el reclutamiento de macrófagos y reprograman células supresoras, invirtiendo sus funciones inhibidoras. [31]

Como ya se ha mencionado, la inmunoterapia implica fortalecer el sistema inmunitario del paciente con cáncer, restaurando su capacidad para reconocer el tumor o proporcionando una función efectora inmune faltante, para eliminar las células neoplásicas. De acuerdo al mecanismo por el cual producen la activación de una respuesta inmune, las inmunoterapias se han clasificado en aquellas que estimulan la respuesta inmune adaptativa del huésped *in situ* (inmunoterapias activas) y las basadas en activar la respuesta inmune del huésped *in vitro* con su consiguiente re-infusión, que reciben el nombre de transferencia celular adoptiva (ACT) o terapia basada en células (inmunoterapias pasivas):

- Inmunoterapia activa:

La inmunoterapia activa incluye a las vacunas preventivas y terapéuticas, anticuerpos monoclonales inmunomoduladores, es decir, inhibidores inmunes *checkpoint* y citocinas inmunoestimuladoras. Dentro de este tipo de inmunoterapia destacan los inhibidores inmunes *checkpoint* centrados en PD-1, PD-L1 y CTLA-4, proteínas que están presentes en las células T capaces de unirse a sus receptores en las células tumorales o en las APCs, lo que provoca un efecto inhibitorio de la función de las células T. En los últimos años, las estrategias se han enfocado en bloquear la unión de las proteínas inmunes *checkpoint* y sus receptores, con el fin de restaurar la función de las células T para destruir a las células tumorales. Así, el uso de inhibidores inmunes *checkpoint* como anti-PD-1 (pembrolizumab y nivolumab), anti-PD-L1 (MPDL3280A) y anti-CTLA-4 (ipilimumab) han sido aprobados y han tenido gran éxito al mejorar la respuesta antitumoral efectora en diferentes neoplasias malignas, como melanoma y cáncer de pulmón, provocando respuestas clínicas duraderas y mejorando la supervivencia. [4, 18]

- Inmunoterapia pasiva:

En la inmunoterapia pasiva se encuentra la transferencia de células T adoptivas o terapia con células CART, que utilizan linfocitos T de pacientes que han sido modificados genéticamente *in vitro* para que expresen un CAR capaz de unirse a los antígenos de las células tumorales y mejorar así la función de las células T en la destrucción de las células neoplásicas. La terapia CART ha mostrado ser muy prometedora para tratar diversos tipos de cánceres, tal que actualmente su uso ha sido aprobado para tratar algunas neoplasias hematológicas [4]. Dado que este trabajo se centra en CART, en el próximo ítem se abordará en detalle este enfoque terapéutico.

Las diferentes estrategias terapéuticas, especialmente los inhibidores inmunes *checkpoint* y la terapia CART, están teniendo un impacto sustancial en el tratamiento de algunos pacientes con cáncer avanzado, previamente no tratables, incluso utilizándolos como monoterapias. Estos éxitos han abierto la posibilidad de explorar combinaciones de tratamiento con el fin de intervenir en las diferentes vías del ciclo de inmunidad del cáncer y así lograr transformar las inmunoterapias actuales y futuras, mejorando su eficiencia y el pronóstico para muchos pacientes. Actualmente, en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, los enfoques innovadores de alto rendimiento, la ciencia computacional, la bioinformática y la nanotecnología están cumpliendo roles protagónicos y cambiando el panorama del desarrollo de fármacos y diagnósticos. [12, 49]

Cada vez se informa de más casos de vidas que se están extendiendo e incluso cánceres que han remitido por completo gracias a las inmunoterapias disponibles. Pese a los esfuerzos, estas nuevas modalidades aún muestran una efectividad deficiente en tumores sólidos y cánceres avanzados, toxicidades y eventos adversos graves, alto costo y

complejidad técnica del procesamiento, todos los cuales limitan severamente sus aplicaciones clínicas. Los científicos mantienen intactas las esperanzas en este campo y la posibilidad de sortear tales obstáculos para caminar hacia un resultado inmunoterapéutico antitumoral satisfactorio. Los desafíos actuales apuntan a comprender mejor los mecanismos de las células cancerosas para evadir el ataque inmunológico y a dilucidar aquellos que median la generación de heterogenicidad antigénica de los tumores. La preparación de nuevos repertorios de células T durante la tumorigénesis puede ser fundamental para desencadenar respuestas de los CTLs específicos de antígeno, así como también establecer estrategias óptimas para romper el agotamiento de las células T efectoras específicas del tumor en TMEs inmunosupresoras orquestadas por células Tregs y otros actores inhibidores. [12, 18, 49]

3. Inmunoterapia antitumoral con células CART

Como enfoque inmunoterapéutico pasivo, la terapia con células CART ha demostrado ser significativamente ventajosa, ya que supera la evasión inmune causada por la célula cancerosa, haciéndola nuevamente susceptible de ser reconocida por el sistema inmune del paciente. Basado en la ACT, los linfocitos T son modificados genéticamente *ex vivo* para expresar el CAR y luego transferirlos al individuo con cáncer. [4]

El procedimiento más común para la terapia celular con CART comienza con la extracción de células T a partir de sangre periférica del paciente, a través de un proceso de filtración especializado llamado leucoféresis, donde se separa el material biológico específicamente para la retención de linfocitos con la posterior reinfusión del resto de los componentes al individuo [4]. Los linfocitos se modifican genéticamente *in vitro* para que expresen el CAR a fin de mejorar la unión de las células T a los antígenos tumorales, en un proceso llevado a cabo mediante principalmente mecanismos virales (transducción con lentivirus inactivados) y en menor medida por mecanismos no virales (métodos de transfección con transposones y mRNA, nanopartículas, liposomas, electroporación o usando la tecnología CRISPR/Cas9 [52]. Posteriormente, las células CART creadas son expandidas *in vitro* con IL-2 y sometidas a un estricto control de calidad, tras lo cual son reinfundidas previo tratamiento del paciente con quimioterapia linfodepletora para reducir los niveles de leucocitos y ayudar al cuerpo a aceptar las células CART. Una vez dentro del paciente, estas células tienen el potencial de reconocer a las células cancerosas y a otras que expresan un antígeno específico y atacarlas [4]. (Ver **Figura 1.2**)

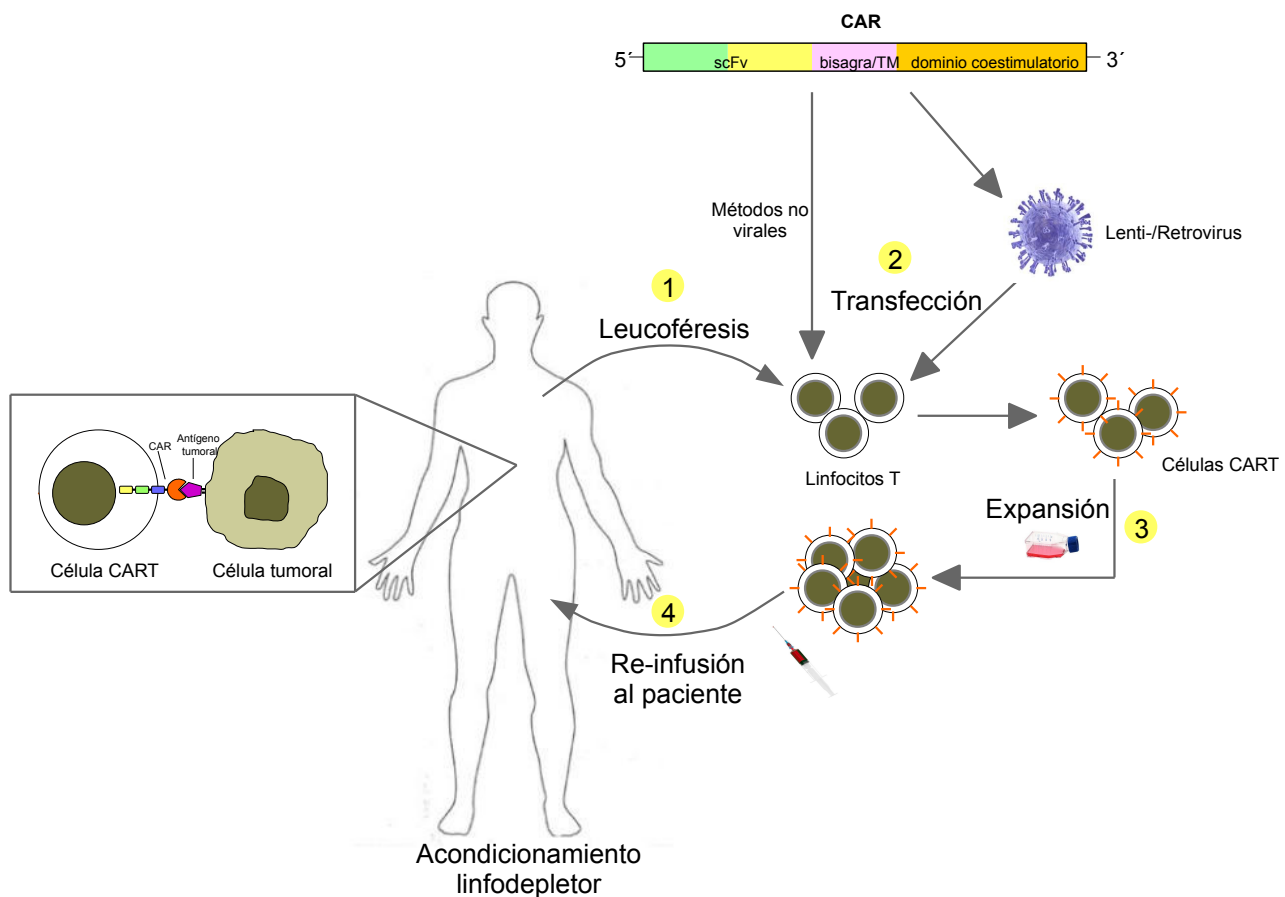


Figura 1.2: Principio general de la terapia con células CART.

3.1. Receptores de antígeno quiméricos (CARs)

La biología sintética, el campo multidisciplinario que permite manejar los elementos genéticos de las células, han permitido desarrollar una de las herramientas más destacadas: los receptores de antígeno quiméricos o CARs. Los CARs son proteínas sintéticas diseñadas para ser expresadas sobre la superficie celular de células inmunes, tales como las células T, para facilitar el reconocimiento mejorado y la eliminación de células malignas [53]. Los CARs constan de una región extracelular formada por dominios que reconocen a un antígeno en particular y de una región intracelular con varios motivos funcionales de la célula T que promueven la actividad citolítica sobre las células portadoras de tales antígenos. De esta manera, los CARs cumplen una función dual: a) el reconocimiento inmune de antígenos tumorales expresados en la superficie de células cancerosas, y b) la promoción activa y propagación de eventos de señalización. Es un sistema que tiene las ventajas de: 1) proporcionar “células T reprogramadas” de un

mecanismo de activación *ex-novo*; 2) romper la tolerancia adquirida por las células tumorales, y 3) *bypasear* restricciones del reconocimiento de antígeno mediado por HLA, sobrepasando las barreras a una aplicación más extendida de la inmunoterapia celular [54].

Este enfoque nació en la década de los 80 a raíz del trabajo desarrollado por Gross y col., que involucró la ingeniería genética y la expansión *ex vivo* de células T singénicas diseñadas para dirigirse directamente a antígenos tumorales del paciente [53]. En 1993, el Dr. Zelig Eshhar y col., crearon la primera molécula de CAR (CAR de primera generación) y pudieron demostrar que la unión del fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo monoclonal con la cadena ζ o la cadena γ del TCR para la transducción de señales, proporcionaba a los linfocitos una especificidad tipo anticuerpo y activaba todas las funciones de una célula efectora, incluyendo la producción de IL-2 y la lisis de las células diana [54].

3.1.1. Diseño de los CARs

Los CARs son el resultado de la combinación de diferentes módulos funcionales en la estructura de una proteína de fusión (**Figura 1.3**). Cada una de sus secciones, denominadas como ectodominio, bisagra, dominio transmembrana y endodominio, tienen una constitución y un funcionamiento que son determinantes en la eficacia de los CARs y que se pasan a detallar a continuación:

1. Endodominio:

Corresponde al dominio extracelular y es el responsable del reconocimiento del antígeno objetivo. Consiste típicamente en un scFv de un anticuerpo monoclonal compuesto por una cadena variable ligera y otra pesada, unidas por un enlazador flexible [55, 56]. La unión del CAR al antígeno seleccionado es usualmente mediado por el scFv en una interacción de mediana a alta afinidad e independiente del MHC (el scFv se une a antígenos de superficie intactos). El scFv determina la selectividad y afinidad del receptor, siendo un componente clave en la función del CAR, de modo que scFvs de alta afinidad tienen una función efectora superior a los de baja afinidad. Adicionalmente, la actividad citolítica es afectada también por la localización del epítipo reconocido en el antígeno, observándose que cuanto más cerca está el epítipo de la membrana de la célula objetivo, el efecto citotóxico es superior. Resulta fundamental que el diseño y manipulación del scFv sean muy cuidadosos, dado que no sólo basta con considerar la incorporación de una secuencia de un anticuerpo específico para el antígeno objetivo, sino también deben tenerse en cuenta todos los elementos de la estructura que influyen tanto en el funcionamiento como en la especificidad y el direccionamiento diferencial, con el fin de que sean reconocidas las células tumorales y no las normales [57, 58].

Si bien el ectodominio basado en scFv ha permitido un enfoque dirigido al usar anticuerpos para atacar antígenos de la superficie celular (incluidos proteínas, carbohidratos o glicolípidos), ampliándose con ello el alcance más allá de los objetivos TCR-péptidos-MHC restringido, resulta necesario avanzar hacia modificaciones de esta estructura. Los recientes enfoques han apuntado al desarrollo de diseños con ectodominios dirigidos a múltiples antígenos e incluyendo elementos inducibles, con el fin de mejorar la inducción de respuestas efectoras en las células CART sometidas a contextos de tumores sólidos, donde las respuestas clínicas son aún deficientes. Dentro de estos enfoques se encuentra el CAR de doble cadena (dcCAR) que utiliza el dominio de unión del anticuerpo en su forma natural como heterodímero, de manera tal que tanto la cadena ligera como la pesada de la inmunoglobulina se expresan simultáneamente, proporcionando una mayor estabilidad comparado con el formato scFv. Otra de las estrategias involucra la incorporación como ectodominio de un receptor o ligando conocido para el TAA dando origen a los CARs basados en ligandos naturales, como sucede con el CAR que contiene IL-13 (dirigido a IL-13R α 2) o el CAR portador de T1E (reconoce dímeros HER2/ErbB2 y ErbB presentes en muchos tumores sólidos), los que han demostrado resultados prometedores en ensayos clínicos. Los constructos que incorporan un ectodominio scFv en el TCR humano mediante la unión de varias subunidades CD3, conocidos con el nombre de TruCs, han mostrado también resultados alentadores *in vivo*. Han evidenciado ser capaces de hacer un reconocimiento de antígeno basado en anticuerpos mientras se mantiene la señalización en las células T por todo el complejo TCR, demostrando una mayor persistencia y respuesta que las células CART, aunque aún restan más estudios clínicos. [53]

Existen otros enfoques, denominados receptores inmunes universales (UIRs), que han nacido para superar los obstáculos que presentan las inmunoterapias actuales con células CART y están basados en el diseño de productos flexibles “listos para usar”. En este contexto, los nuevos diseños han adoptado un sistema de “llave de bloqueo” que utiliza una molécula intermediaria en la detección del antígeno objetivo, ampliándose con ello la especificidad antigénica. Esto ha llevado a la creación de un CAR “universal”, el cual puede luego ser usado con varias moléculas adaptadoras. Son varios los tipos de UIRs con especificidad adaptable, los que incluyen a: 1) receptores de citotoxicidad dependientes de anticuerpos (ADCC), los que al ser incorporados como dominios de unión a antígenos en células efectoras (tales como en células NKs), facilitan la ADCC de las células tumorales objetivo, como lo han demostrado las células T transducidas con CAR-CD16, capaces de reconocer y destruir células cancerosas recubiertas con anticuerpos monoclonales terapéuticos; 2) enlaces mediados por proteínas biespecíficas, donde un receptor inmune CAR de unión a biotina (CAR-BBIR) utiliza el sistema biotina-avidina como mecanismo intermediario para unir las células CART a un antígeno, de modo que se reemplaza el ectodominio de scFv por avidina y así el CAR puede dirigirse universal y simultáneamente hacia múltiples TAAs que se encuentren recubiertos con anticuerpos monoclonales biotinilados; 3) CARs anti-*tag*, que utilizan scFvs dirigidos a *tags* moleculares o péptidos químicamente conjugados capaces de unirse a antígenos tumorales, destacando los enfoques que contemplan el *tag* fluorescente

isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el péptido neoepítipo (PNE), que han mostrado mejorar la persistencia de las células CART a largo plazo; y 4) CARs que utilizan interacciones *tag*-específicas, por ejemplo, el sistema CAR-SUPRA, donde un ectodominio zipFv (compuesto de un scFv y una cremallera de leucina) reconoce y se une al TAA mediante el scFv, mientras la cremallera de leucina se une a una segunda cremallera de leucina presente en el dominio de señalización zipCAR, desencadenando la activación de la célula T. Este enfoque permite el reconocimiento de múltiples antígenos sin la necesidad de reprogramar la estructura del receptor, lo que supone ventajas sobre la técnica CAR convencional. [53]

Pese a la creciente flexibilidad y variabilidad que se ha logrado en el diseño de CARs usando UIRs, todavía hay una serie de obstáculos que sortear, particularmente en el entorno de cánceres sólidos. Por ello, las estrategias actuales están focalizadas en apuntar a múltiples antígenos tumorales de forma simultánea para así eliminar tumores heterogéneos más rápidamente. Esto ha motivado el desarrollo del CAR dual, donde sobre la célula T se logra una expresión simultánea de CARs con diferentes scFvs dirigidos a dos antígenos separados, facilitándose con ello el direccionamiento simultáneo hacia múltiples TAAs expresados diferencialmente dentro de los cánceres. Una variación del CAR dual lo constituye el CAR en *tándem* o TanCAR, que involucra el diseño de un receptor con dos scFvs en su ectodominio, lo que permite el reconocimiento y destrucción de las células tumorales que poseen los dos antígenos diferentes en su superficie al mismo tiempo. Así, ambas modalidades ofrecen ventajas sobre las células CART convencionales, al ser capaces de destruir sólo las células neoplásicas que posean los dos antígenos tumorales diferentes, que se encuentren por separado en tejidos sanos, lo que limita la toxicidad *off-tumor*. [53]

2. Dominios bisagra y transmembrana:

Inicialmente, los dominios bisagra y transmembrana fueron considerados como regiones con un rol predominantemente estructural. Sin embargo, actualmente se sabe que juegan un papel clave en el funcionamiento del CAR, al influir en el nivel de señalización del receptor en las células T y en otros aspectos importantes de su actividad. [59]

La bisagra o espaciador es la región estructural extracelular del CAR que separa el ectodominio del dominio transmembrana y generalmente corresponde a un dominio tipo inmunoglobulina (Ig), aunque también se está utilizando CD28 y CD8 α ampliamente. Pueden afectar el rendimiento general de las células CART, dado que proporcionan estabilidad para una expresión y actividad eficientes del CAR, así como flexibilidad para acceder a su antígeno objetivo; también pueden controlar la modalidad de expresión y la eficiencia de transporte de membrana del receptor, junto con determinar la intensidad de su señalización. Se ha demostrado que algunas de estas capacidades son influidas por la longitud y composición del dominio bisagra. Así, se ha

visto que bisagras largas brindan flexibilidad adicional al CAR y permiten un mejor acceso a los epítopes proximales a la membrana o antígenos glicosilados complejos, mientras que los CARs con bisagras cortas son más efectivas para unirse a los epítopes distales a la membrana. En lo referente a su naturaleza, las bisagras derivadas de IgG humana consistentes en dos dominios tipo Ig, CH2 y CH3, han sido ampliamente usadas al contribuir en el reconocimiento eficiente de antígenos y son especialmente útiles para evaluar el nivel de expresión del CAR en la superficie de la célula T; en tanto que los dominios bisagras derivados de CD8 α o CD28 son relevantes como reguladores del umbral de señalización del CAR, aunque muestran diferencias significativas entre ellas al comparar su funcionamiento en las células CART. [58, 59]

El dominio transmembrana es la región que atraviesa la membrana celular y consiste en una hélice α hidrofóbica. Los CARs de primera generación fueron diseñados utilizando la cadena ζ del CD3 (CD3 ζ) en el dominio transmembrana, mientras que para los de segunda y tercera generación se ha recurrido principalmente a CD4, CD8 α o CD28, siendo estos dos últimos los más extensamente usados. Si bien su función principal es estabilizar el CAR al anclarlo en la membrana de la célula T, la evidencia ha demostrado que es relevante para el funcionamiento de las células CART [56, 58, 59]. Aún no están claros los mecanismos precisos responsables de la transducción de señales de activación desde el ectodominio al endodominio, pero se cree que el comportamiento es similar al del TCR y que el dominio transmembrana desempeñaría roles claves en ello. Se ha demostrado que existe una interrelación entre el CAR codificado por el transgén y los componentes endógenos de la maquinaria de activación de las células T, tal que se ha observado que en los CARs de primera generación se necesita la presencia de CD3 ζ en la transmembrana para la dimerización o incorporación del CAR en grupos de TCRs endógenos. La evidencia ha mostrado que estas interacciones CAR-TCR y la dimerización son requisitos previos para la activación óptima de las células T transducidas impulsada por el CAR y que los CAR que incorporan CD3 ζ en el dominio transmembrana tienen la capacidad de activar las células T tanto directamente a través de la cadena de señalización mediadas por el propio CAR como indirectamente mediante la cadena de señalización del CD3 ζ endógeno y de otros componentes indefinidos del complejo TCR [60]. Otros estudios han puesto en evidencia que el uso de los dominios transmembrana CD8 α y CD28 pueden regular la intensidad de la señalización del CAR en las células T a través del control del nivel de expresión superficial del receptor y la estabilidad que le brindan. Existen también investigaciones que indican que la vinculación del dominio intracelular proximal a su dominio transmembrana correspondiente puede permitir la señalización adecuada de las células CART, así como se ha visto con los CARs que contienen el dominio intracelular de ICOS (coestimulador de células T inducible o *inducible T cell coestimulator*), que requieren de la incorporación del dominio transmembrana de ICOS, en lugar de CD8 α , para aumentar la persistencia de las células CART y la eficiencia antitumoral general. Tales resultados también sugieren que el dominio transmembrana de ciertas moléculas coestimuladoras puede estar involucrado en la formación de sinapsis o en la señalización de las células T. Relacionado también con lo mencionado, hay estudios que demuestran que los dominio extracelulares

y transmembrana de CD8 α pueden inducir parcialmente la activación de las células T [56, 58, 59].

3. Endodominio:

El endodominio o dominio intracelular es la región externa y funcional del receptor, la encargada de desencadenar la activación de la célula T tras la interacción antígeno-CAR. Para ello, el endodominio debe contener un inmuno-receptor con motivos de activación basados en tirosina (ITAM), siendo el componente más común el CD3 ζ (un elemento crítico del TCR) que incluye tres motivos ITAM. Si bien para la activación de las células T es suficiente la incorporación de un dominio CD3 ζ , se requiere la adición de componentes coestimuladores en el endodominio para mejorar significativamente la activación, función y persistencia de las células CART, dado que proporcionan las señales secundarias necesarias para una activación robusta. Así, a los CARs de primera generación, que contenían sólo CD3 ζ , le sucedieron los de segunda y tercera generación, que adicionaron un motivo coestimulador (segunda generación) y dos motivos coestimuladores (tercera generación). [53, 56]

Han sido muchos los esfuerzos para tratar de comprender los efectos de la coestimulación de los CARs, con el motivo de identificar aquellos motivos óptimos para ser incorporados en su diseño. Se utilizan una serie de moléculas de coestimulación, incluidas las de la familia CD28, como CD28 e ICOS; y las de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), que consta de CD27, OX40 y 4-1BB. Las dos moléculas de coestimulación más utilizadas clínicamente son CD28 y 4-1BB. La familia CD28 emite señalización a través de la vía PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) que induce una proliferación potente de las células T y la producción de IL-2, induciendo ICOS una activación de PI3K más fuerte que CD28. En tanto, los miembros de la familia TNFR, como 4-1BB, señalizan mediante el reclutamiento de proteínas TRAF (*TNF receptor associated factor*) y están implicados en la modulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células CART. [53, 58]

Cada dominio coestimulador posee propiedades únicas y su selección es fundamental para adaptar óptimamente la función y el destino de las células CART. La coestimulación mediada por CD28 es muy importante en la regulación de la proliferación y supervivencia de los linfocitos, de manera que las células CART que lo incorporan muestran una alta función efectora pero una expansión autolimitada que les impide persistir por mucho tiempo. Por el contrario, los CARs basados en 4-1BB inducen una respuesta efectora de las células T más lenta pero más persistente. Estos hallazgos han quedado en evidencia a raíz de ensayos clínicos para tratar neoplasias malignas de células B, donde se utilizaron células CART que incorporaban los dominios CD28 o 4-1BB. Si bien ambos diseños mostraron tasas de respuestas similares, hubo diferencias significativas en la persistencia, lo que llevó a concluir a que los primeros se convierten en ideales para tratar enfermedades transitoriamente con una rápida

eliminación del tumor y una persistencia a corto plazo de células CART (como puede ser una terapia puente para el trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas); en tanto que los segundos pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades en las que las respuestas completas requieren una persistencia sostenida de células T. [56, 58]

En línea con los dominios coestimuladores, los estudios también han evidenciado que la señalización de CD27 mejora la supervivencia de las células CART en comparación con CD28, de un modo similar a 4-1BB. Recientemente se ha sugerido que varios subconjuntos de linfocitos requieren diferentes señales de coestimulación para un funcionamiento y persistencia óptimos, de modo que se ha visto que la incorporación de ICOS como dominio intracelular mejora la persistencia de las células CART CD4+ en comparación con CD28 y 4-1BB, mientras que el dominio intracelular 4-1BB la proporciona en las células CART CD8+. [58]

Con la finalidad de activar simultáneamente diferentes vías de señalización, los esfuerzos se han orientado a unir las propiedades de diferentes dominios intracelulares en una sola célula combinándolos en los CARs de tercera generación, donde se incluyen generalmente un dominio de la familia CD28 y uno de la familia TNFR. [58]

En los intentos por probar otros motivos con funciones más diversas y ampliar así las posibilidades, se han incorporado moléculas no coestimuladoras al endodominio. Es así como se desarrolló el concepto de células T redirigidas para la muerte universal mediada por citocinas o TRUCKs (por sus siglas en inglés), dando lugar a los denominados CARs de cuarta generación, donde las células CART liberan un producto transgénico, como IL-12, hacia el tejido tumoral objetivo para modular las respuestas de las células T [61]. Actualmente se encuentra en marcha una nueva generación de CARs, los conocidos como CARs de quinta generación, que difieren de los anteriores al integrar un receptor de membrana adicional para activar vías de señalización específicas que permiten no sólo estimular las células CART para que permanezcan activas y formen células T de memoria, sino que también reactiven el sistema inmune para que responda a la reestimulación. Se han probado otros enfoques, entre los que destacan los “receptores *switch*” que incorporan un interruptor de apagado (OFF) que conduce al agotamiento/inhibición del CAR o un interruptor de encendido (ON) que lleva a la activación, en un mecanismo controlado por fármacos [62 , 63].

Es evidente que la selección de los dominios de coestimulación es vital para adaptar la función efectora, la supervivencia y el destino óptimo de las células CART; sin embargo, no está claro qué dominio es el más adecuado para cada receptor en cada tipo de tumor y es poco probable que se pueda encontrar un dominio de coestimulación que sirva para todos los propósitos. Los estudios actuales buscan comprender mejor los efectos de la señalización molecular de los CARs que puedan contribuir a elegir el o los dominios intracelulares óptimos para cada condición. Lograr ajustes finos de la intensidad de señalización en el endodominio y de la afinidad en el ectodominio permitiría personalizar todos los componentes del diseño del CAR, cubriendo así una

serie de posibilidades y logrando respuestas de células CART adaptadas a cada situación. [53]

Dado que no ha sido posible definir un diseño óptimo de CAR, actualmente cada construcción requiere ensayos empíricos para evaluar sus efectos, puesto que los estudios han demostrado que pequeñas modificaciones pueden tener consecuencias importantes en el éxito terapéutico con células CART. [58]

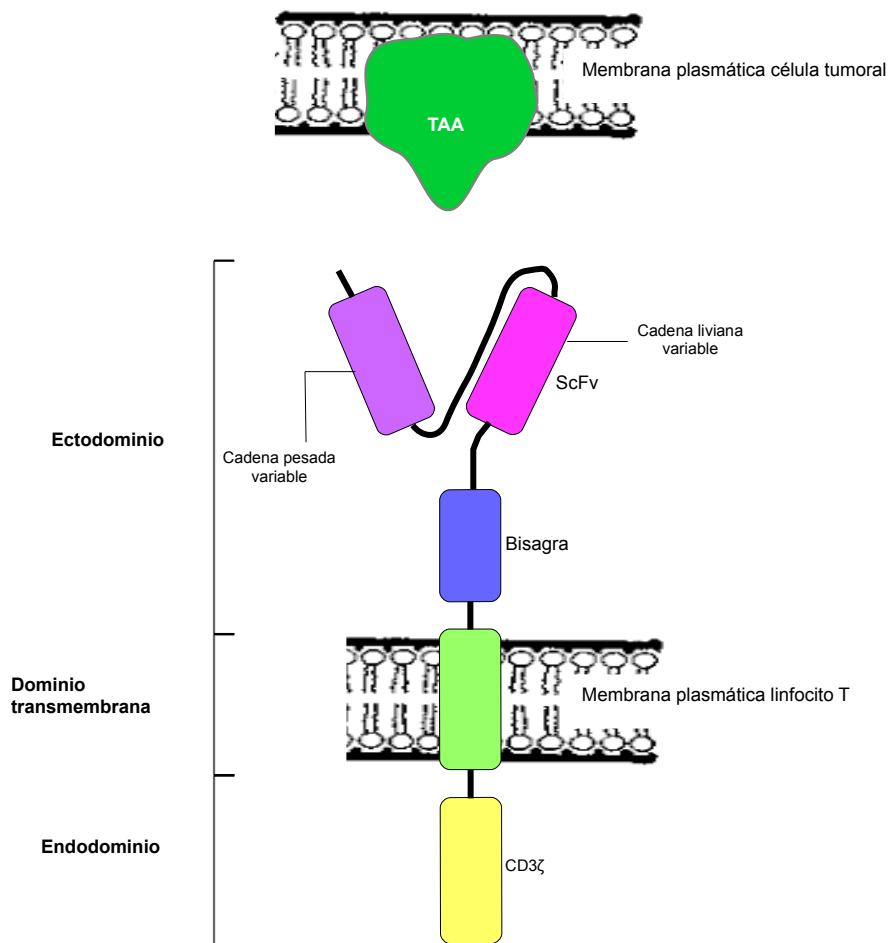


Figura 1.3: Diseño general de un CAR

3.1.2. Evolución de las células CART

A partir del año 1989, cuando se inició el desarrollo de los CARs, se han creado numerosos diseños buscando mejorar la calidad, fuerza y duración de las señales liberadas por el receptor. Esto ha conducido a una amplia variabilidad en las propiedades funcionales y ha motivado a que las células CART sean divididas en cinco generaciones según la estructura del endodominio (**Figura 1.4**):

-CARs de primera generación:

Los CARs de primera generación tienen como característica típica estar únicamente constituidos por la cadena ζ del CD3 (principal transmisor de señales del TCR), o menos frecuentemente por Fc ϵ RI γ (receptor de alta afinidad para la región Fc de la IgE). Las células CART que contenían esos CARs monocatenarios no podían producir suficiente IL-2, por lo que para destruir las células tumorales era necesario administrar concomitantemente ésta y otras citocinas. Para tratar diferentes tumores, se realizaron estudios con células CART de primera generación (como CART-MFE ζ , CART-FR α , CART-CE7R, CART-scFv(G250), CART-GD2 y CART-CD10), sin embargo, la mayoría de ellos no lograron los resultados deseados debido a la proliferación inadecuada, una vida corta *in vivo* y una insuficiente secreción de citocinas. [56]

-CARs de segunda generación:

Luego que los CARs que sólo incluyen la secuencia CD3 ζ fueran incapaces de activar las células CART sin una señal estimuladora, surgieron los llamados CARs de segunda generación. Como ya se mencionó en ítems anteriores, en estos CARs se agregó un dominio intracelular de señalización procedente de receptores de proteínas coestimuladoras a la cola citoplasmática de los CARs, con el fin de proporcionar señales adicionales a la célula T y mejorar con ello la proliferación, la citotoxicidad, la respuesta sostenida y prolongar la vida de las células CART *in vivo*. El dominio intracelular más utilizado es CD28 y en menor medida 4-1BB y OX-40. Las células CART-scFvCD19-4-1BB-CD3, las células CART-MOv19-BB ζ y las células CART-scFvCD19-CD28-CD3 ζ se emplearon para tratar neoplasias malignas de células B y lograron mejores resultados que las células CART de primera generación; incluso, en la actualidad, las células CART de segunda generación se utilizan ampliamente en la práctica clínica y han demostrado que no poseen beneficios inferiores a las de tercera generación. [56, 61]

-CARs de tercera generación:

En los CARs de tercera generación se incorpora un tercer dominio de coestimulación (CD27, ICOS, 4-1BB u OX-40) que se añade a la cadena ζ y al CD28. La combinación

de dominios de señalización, tales como CD3 ζ -CD28-OX40 o CD3 ζ -CD28-4-1BB, fueron creados para aumentar la potencia, proliferación de las células T, sobrevivencia, con una mayor producción de citocinas (IL-2), de actividad citolítica y duración de las señales liberadas. Basadas en ellos, las células CART-scFvCD20-CD28-4-1BB-CD3 ζ y las células CART-HER2 se utilizaron para tratar el linfoma y el cáncer de colon; sin embargo, los resultados no mejoraron en relación con los de segunda generación [54, 56]. En otro enfoque, recientemente un nuevo CAR19 de tercera generación que integra el dominio CD28 con el dominio coestimulador TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) del TLR2 (*Toll-like receptor 2*), mostró resultados sorprendentes al mejorar el poder de destrucción y la expresión de las células CART administradas a pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), lográndose en todos ellos una remisión completa. Aunque los resultados son muy prometedores, se requieren sin duda más estudios para explorar más profundamente la seguridad y eficacia de estos tratamientos. [53]

-CARs de cuarta generación:

Si bien las células CART de segunda y tercera generación cuentan con dominios coestimulatorios que mejoran la respuesta inmune, los CARs de cuarta generación se crearon agregando moléculas no coestimuladoras, como citocinas, a la base de las construcciones de segunda generación. Estos CARs de cuarta generación corresponden a los denominados “CARs blindados” o TRUCKs (*T cell redirected for universal cytokine-mediated killing*) y fueron diseñados para eliminar células cancerosas que no expresan antígenos tumorales o cuya expresión es muy baja, y para incrementar la persistencia de las células CART en el TME. Hasta ahora, los CARs que incorporan IL-12 son los más probados y han demostrado que, tras reconocer el antígeno, desencadenan la secreción de IL-12 e IL-2, aumentan la activación y citotoxicidad de las células CART, junto con activar y atraer células inmunes innatas al tumor objetivo. [56]

-CARs de quinta generación:

Las células CART de quinta generación incorporan un receptor de membrana como dominio coestimulatorio y el enfoque más prometedor se basa en la adición de la cadena β del receptor de IL-2 truncado (IL-2R β) y un motivo de unión a STAT3. La activación de este tipo de CAR puede impulsar la señalización integral del TCR con la señalización coestimuladora JAK-STAT inducida por citocinas, lo que permite mejorar la proliferación y supervivencia de las células CART. Otro de los enfoques esperanzadores son los “receptores *switch*” o “interruptores”, donde un fármaco controla las funciones efectoras de las células CART, de manera que el interruptor de apagado conduce al agotamiento de estas células, mientras que el de encendido induce su activación. Los datos han demostrado que *in vitro* estos sistemas son un poco menos eficaces, aunque igualmente evidenciaron una actividad antitumoral rápida, reversible y clínicamente adecuada. Al ser más controlables que las generaciones anteriores de CARs, muestran un

mejor perfil de seguridad y una ventana terapéutica más amplia. Estas nuevas estrategias, si bien son muy alentadoras, aún se encuentran en fase de investigación y los datos en entornos clínicos siguen siendo limitados. [62, 63]

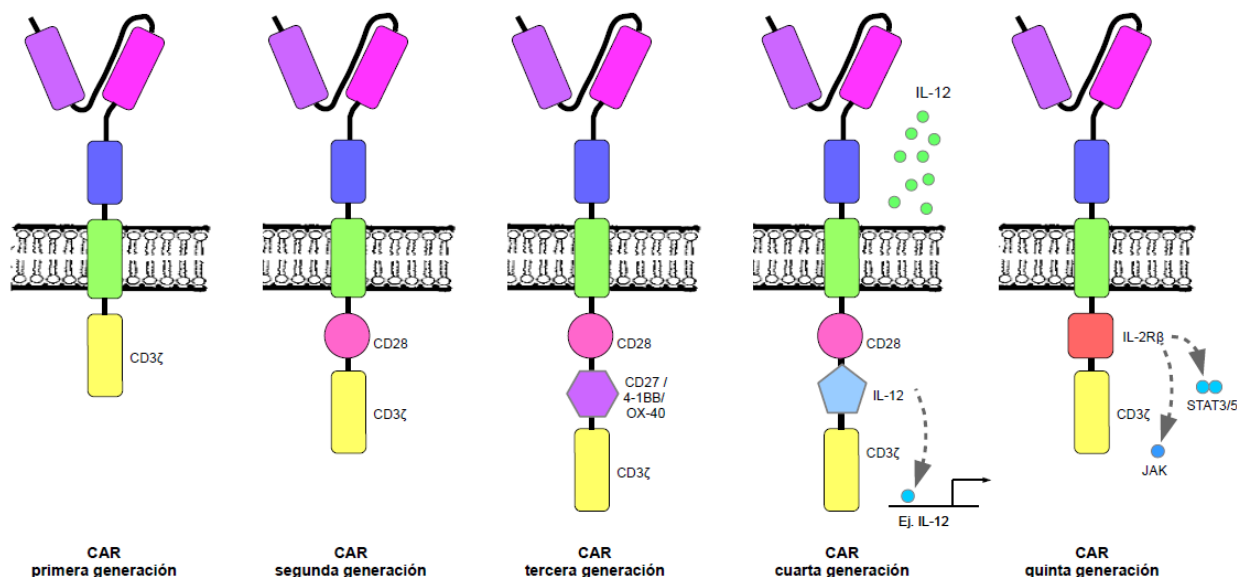


Figura 1.4: Estructura de las diferentes generaciones de CARs.

3.2. La inmunoterapia CART como tratamiento para neoplasias malignas de células B

3.2.1. Los enfoques terapéuticos para las neoplasias malignas de células B

Las neoplasias malignas de células B surgen de diferentes etapas de diferenciación de las células B [64] y constituyen un grupo heterogéneo de cánceres caracterizados por la producción descontrolada de estos linfocitos que causa linfocitosis monoclonal, linfadenopatía e infiltración en médula ósea [65] y que incluyen a linfomas de células B, leucemias de células B y discrasias de células plasmáticas [66]. Para conocer la clasificación detallada de estas neoplasias, revisar la “*World Health Organization (WHO) classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues*”, 4ta edición revisada, 2016.

Históricamente, el régimen terapéutico para estos síndromes linfoproliferativos ha consistido en quimioterapia citotóxica (que incluye ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, clorambucilo, fludarabina, citarabina) acompañado de fármacos esteroides (prednisona, betametasona). Para la enfermedad localizada se recurre a la resección quirúrgica o radioterapia con IL-2 como adyuvante o combinada con anticuerpos

monoclonales, en esquemas que van acompañados de la quimioterapia estándar [65, 67]. En tanto, el trasplante de células madres hematopoyéticas (HSCT) es un tratamiento que es frecuentemente utilizado en pacientes con neoplasias tales como mieloma múltiple, leucemia o linfoma, donde una quimioterapia prolongada no será tolerada o en los casos de enfermedad recurrente/refractaria. El HSCT requiere de la administración previa de quimioterapia con o sin irradiación, lo que se denomina “régimen de acondicionamiento”, cuyo propósito es ayudar a erradicar la enfermedad del paciente antes de la infusión de las células madres hematopoyéticas y suprimir las reacciones inmunitarias [68, 69].

Si bien los regímenes quimioterapéuticos se mantienen plenamente vigentes a pesar del advenimiento de nuevos agentes terapéuticos, frecuentemente producen toxicidad y otros efectos nocivos. La irrupción de la inmunoterapia, a través de los anticuerpos monoclonales dirigidos a TAAs, representaron un avance importante en la búsqueda de fármacos con mayor especificidad tumoral y menor toxicidad. Los esfuerzos en esta dirección han apuntado a antígenos específicos de la diferenciación de la célula B, como CD19, CD20 y CD22 como oportunidades ideales para un tratamiento terapéutico dirigido a un agente único. [64]

Los enfoques basados en anticuerpos monoclonales y/o conjugados hacia CD20 fueron una de las primeras formas de enfocarse en las células B y actualmente forman parte del tratamiento estándar para ciertos linfomas no Hodgkin (LNH), leucemia linfática crónica (LLC) y leucemia linfoblástica aguda (ALL) del adulto [64]. El anticuerpo monoclonal humanizado rituximab se dirige y se une al antígeno de la superficie celular CD20, presente en las células B normales y malignas, induciendo la eliminación de éstas a través de la ADCC, la citotoxicidad mediada por el complemento (CDC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y de otras vías de muerte celular desencadenadas directamente por la unión del rituximab a CD20 [67, 70]. Rituximab puede actuar solo, sin embargo, al combinarlo al régimen de quimioterapia, muestra un efecto sinérgico que se traduce en mejoras importantes en las tasas de respuesta y en aumentos en la supervivencia general en varios tipos de neoplasias de células B. Además, como terapia de mantenimiento, el rituximab administrado después de la quimioterapia, prolonga significativamente la supervivencia sin progresión de la enfermedad. Si bien el rituximab se ha utilizado desde 1997, en la actualidad puede ser reemplazado por nuevos anticuerpos anti-CD20, como los anticuerpos monoclonales obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab y ocrelizumab, los anticuerpos CD20/CD3 y también por aquellos conjugados a radioisótopos, como ^{131}I -tositumomab y ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan, que permiten administrar estos isótopos directamente a los linfocitos B [67, 70, 71].

Además de CD20, otros antígenos que se expresan en las células B, como CD19, CD22 y CD38 se han ganado la atención recientemente para las aplicaciones en inmunoterapia. Así, la FDA (*Food and Drug Administration*) primeramente aprobó blinatumomab, un tipo de anticuerpo monoclonal de los llamados BiTE® (molécula

biespecífica captadora de células T o *bispecific T-cell engager*), que posee una afinidad alta con las células T y con las células B CD19+, incrementando la conexión entre ellas y favoreciendo la acción de las células T. Tras los resultados exitosos, en especial en la prolongación de la supervivencia, otras inmunoterapias dirigidas a CD19 se han expandido, incluyendo otros anticuerpos monoclonales y los conjugados anticuerpos monoclonales-fármaco. Los enfoques dirigidos a CD22 han derivado en el desarrollo del anticuerpo no conjugado epratuzumab y luego de epratuzumab-90Y (el anticuerpo va radiomarcado con 90Y), los que pueden administrarse solos o combinados con quimioterapia. Otros anticuerpos monoclonales anti-CD20 aprobados por la FDA, como inotuzumab ozogamicina, donde el anticuerpo monoclonal va conjugado a caliqueamicina; y moxetumomab, que va conjugado a la exotoxina de *Pseudomonas*, han demostrado también actividad clínica. Dentro de las terapias dirigidas a CD38, el daratumumab que fue aprobado por la FDA para ser utilizado en mieloma múltiple (MM) ya sea solo o combinado con otros enfoques. [64]

Si bien cada vez son más los pacientes con neoplasias malignas de células B que se han tratado con agentes más nuevos en combinación con modalidades más establecidas y donde las estrategias basadas en anticuerpos monoclonales han demostrado ser un armamento efectivo, las toxicidades y otros efectos adversos asociados siguen siendo uno de los principales obstáculos. [64]

Una revolución como nuevos enfoques terapéuticos lograron los inhibidores de punto de control inmunológicos o inhibidores *checkpoint* y las células CART en los pacientes con neoplasias malignas de células B recurrentes y refractarias. Los inhibidores checkpoint que bloquean la vía PD-1/PD-L1 y CTLA-4 han mostrado resultados prometedores en linfomas de células B y condujo a que la FDA aprobara en la década pasada el uso de los anticuerpos anti-PD-1 nivolumab y pembrolizumab, y de los anticuerpos anti-PD-L1 durvalumab, atezolizumab y avelumab; mientras que para inhibir CTLA-4 se aprobaron los anticuerpos tremelimumab e ipilimumab. A pesar de la notable implementación de estas terapias en los últimos años para ciertos subtipos de linfomas, hasta la fecha pembrolizumab es el único agente aprobado por la FDA para su uso en pacientes con LNH-B, dado que la mayoría de estos abordajes están asociados con eventos adversos que pueden llegar a ser graves [72]. Los resultados sin precedentes evidenciados por la terapia con células CART-CD19 demostraron el tremendo potencial de esta modalidad de tratamiento y actualmente son muchos los estudios que se están realizando simultáneamente con células CART dirigidos a neoplasias linfoides de células B. Dado que se trata del tema central de esta tesis, a continuación, se revisará en mayor profundidad este tópico.

3.2.2. El enfoque CART19

En las neoplasias malignas de células B, el CD19 es un TAA que desempeña un papel más importante que otros marcadores de membrana y, por lo tanto, su expresión

rara vez se pierde. El CD19 además de expresarse en las células B neoplásicas, también se expresa en células B normales y precursores de células B, pero no en células madres pluripotentes, lo que lo convierte en el objetivo central de las inmunoterapias para neoplasias malignas de células B. [64, 73]

El enfoque terapéutico conocido con el nombre de CART19 se basa en células T modificadas genéticamente para que expresen un CAR anti-CD19 dirigido a reconocer y destruir células B neoplásicas CD19+. Este enfoque ha pasado de ser sólo una oportunidad experimental atractiva a ser una nueva y revolucionaria modalidad terapéutica, luego de que en ensayos clínicos se obtuvieran respuestas clínicas espectaculares en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), linfoma no Hodgkin (LNH) y leucemia linfocítica crónica (LLC), donde las tasas de respuesta varían de 50 a 85%, dependiendo del tipo de neoplasia maligna de células B y la construcción del CAR, observándose una notable ausencia de enfermedad y un aumento en la supervivencia general. [74]

Estos resultados han provenido de varios ensayos clínicos multicéntricos internacionales basados en células CART19 de segunda generación y condujeron a la aprobación por parte de la FDA, EMA (Agencia Europea de Medicamentos) y de otras autoridades reguladoras, de cuatro inmunoterapias para su uso clínico como tratamiento de segunda línea. Así, en el año 2017 se aprobó tisagenlecleucel (Kymriah, Novartis) para el tratamiento de la B-ALL pediátrica y juvenil (hasta los 25 años) y del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) recurrente/refractario (R/R), esperándose que también próximamente sea aprobado para el linfoma folicular (FL) R/R. Posteriormente, se aprobó axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Kyte-Gilead) también como terapia para el DLBCL y además para el linfoma mediastinal primario de células B grandes (PMBCL). Brexucabtagene autoleucel (Kite Pharma) ha sido una de las últimas inmunoterapias aprobadas, de modo que la FDA y la EMA autorizaron su uso clínico en pacientes adultos con linfoma de células de manto (MCL) R/R, y también para B-ALL R/R en adultos tras ser recientemente aprobado por la FDA. En febrero 2021, un cuarto CART19 fue aprobado por la FDA, se trata de lisocabtagen maraleucel (Breyanzi, Juno Therapeutics, Inc), para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células B grandes R/R, incluido DLBCL, el linfoma de células B de alto grado, el PMBCL y el FL de grado 3b. [75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89]

La eficacia de estas inmunoterapias ha sido evaluada en diferentes estudios multicéntricos: Tisagenlecleucel mostró 80% de respuestas completas (RC) en pacientes con B-ALL y en pacientes con DLBCL se obtuvo una tasa de respuesta general de 52% y un 40% de RC. Para axicabtagene ciloleucel, evaluado en pacientes con linfomas de células B grandes R/R (DLBCL, PMBCL y FL), la tasa de respuesta general fue de 83% con 58% de RC. Brexucabtagene autoleucel se evaluó en MCL obteniéndose una tasa de respuesta objetiva de 85% y una RC de 59%; en tanto, otro estudio que sólo consideró pacientes adultos con B-ALL R/R, la RC fue de 65%. Finalmente, en el caso de lisocabtagen maraleucel, el estudio incluyó a pacientes con DLBCL, PMBCL, FL grado

3b y con linfoma de células B de alto grado (HGBCL), arrojando una tasa de respuesta objetiva de 73% con un 53% de RC. [76, 78, 80, 82, 84, 85, 87]. Así también, los análisis multicéntricos retrospectivos, como los realizados en España para evaluar el tratamiento con axicabtagene ciloleucel y tisagenlecleucel en pacientes con linfoma de células B agresivo R/R en el entorno real, han mostrado resultados favorables y comparables en cuanto a seguridad y eficacia a los de los estudios fundamentales y otros efectuados en grandes cohortes [88, 89].

Los resultados de estos estudios son particularmente impresionantes teniendo en cuenta que en la mayoría de los ensayos clínicos CART reclutan pacientes con cáncer que no han respondido a muchos, sino a todos, los otros tratamientos disponibles. Esto ha alimentado las expectativas de pacientes y compañías farmacéuticas por igual, de manera que actualmente hay sobre 200 ensayos clínicos en curso [86]. A pesar de estos resultados sorprendentes, este enfoque terapéutico está actualmente disponible en pocos centros y su alto costo limita el acceso. Desde lo inicios, varios grupos académicos estadounidenses, incluidos la Universidad de Pensilvania, el Memorial Sloan Kettering Cancer Center, el Instituto Nacional del Cáncer y el Fred Hutchinson Cancer Research Center, fueron pioneros en los estudios seminales y desde entonces han utilizado construcciones ligeramente de CARs a nivel de secuencia scFv, dominio coestimulador y región bisagra/transmembrana. Siguiendo la misma línea, nuestro grupo de investigación desarrolló una construcción CAR propia dirigida a CD19 (ARI-0001) con la finalidad de crear un modelo robusto y reproducible, manteniendo un bajo costo, que pueda ayudar a hacer asequible el tratamiento con células CART a todos los pacientes [90].

El nacimiento de las células ARI-0001 surgió de la urgente necesidad de poner un tratamiento CART19 al alcance de los pacientes de instituciones académicas de tamaño mediano que son financiadas con fondos públicos, como son el Hospital Clínic y el Hospital Sant Joan de Déu en Barcelona (España). Basado en la creación de nuestro propio anticuerpo anti-CD19 (A3B1) y en el diseño de CAR desarrollado por la Universidad de Pensilvania en colaboración con el Children's Hospital of Philadelphia (Upenn-CHOP), nuestro grupo creó las células CART19 A3B1:CD8:4-1BB:CD3z (ARI-0001) utilizando un CAR de segunda generación que incorporó el scFv del anticuerpo A3B1 seguido de la región bisagra y transmembrana CD8, un dominio de coestimulación 4-1BB y un dominio de señalización CD3ζ, clonándose la secuencia en un vector lentiviral de tercera generación para su posterior transducción a células T. Luego de demostrar su eficacia *in vitro* y en estudios preclínicos, las células ARI-0001 resultaron ser altamente funcionales y específicas contra las células CD19+, de modo que el siguiente paso fue producir lentivirus y células a gran escala (se utilizó el sistema CliniMACS Prodigy) para ser aplicadas en un ensayo clínico piloto (CART19-BE-01, ClinicalTrials.gov: NCT03144583) destinado al tratamiento de neoplasias malignas CD19+ recidivantes/refractarias en pacientes adultos y pediátricos. Los resultados de este ensayo clínico, lanzado en mayo de 2017 en el Hospital Clínic y el Hospital Sant Joan de Déu, han demostrado que es factible la producción de células CART de grado clínico utilizando este sistema, y que las células ARI-0001 presentan un perfil de

seguridad y eficacia comparables a otras construcciones CART19 usadas en la clínica. Los resultados obtenidos en este ensayo condujeron a que la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) aprobara en febrero de 2021 las células ARI-0001 bajo la Cláusula de Exención Hospitalaria para el tratamiento de pacientes con ALL R/R en mayores de 25 años. De este modo, las células ARI-0001 se convirtieron en el primer producto puramente académico de células CART19 aprobado en Europa para cualquier indicación y transformaron a España en el único país de la Unión Europea donde hay disponible al menos un producto de células CART19 aprobado independientemente de la edad para los pacientes con ALL R/R, esto es, tisagenlecleucel para pacientes más jóvenes y células ARI-0001 para pacientes mayores [74, 90, 91, 92, 93]. Adicionalmente, resultados derivados de pacientes tratados en el ensayo clínico CART19-BE-01 y posteriormente en un programa de uso compasivo, revelaron que la administración de células ARI-0001 también es factible, segura y eficaz en pacientes con LLC o con transformación de Richter de alto riesgo, así como en aquellos con B-ALL R/R y enfermedad extramedular aislada, de un modo comparable con productos similares [93, 94]. Para conocer mayores detalles, revisar las publicaciones de María Castellá y col. [74, 90] y de Valentín Ortiz y col. [91, 92, 93].

Si bien el éxito de las terapias CART19 es indiscutible, han sido vinculadas al desarrollo de complicaciones potencialmente mortales y que pueden causar la suspensión de la terapia. Estos efectos adversos han conducido a que estas inmunoterapias estén limitadas a centros hospitalarios altamente especializados, que cuenten con unidades de cuidado intensivos y un equipo multidisciplinario para el tratamiento de pacientes con CART. Aunque las complicaciones en su mayoría logran ser resueltas, es evidente que esta tecnología requiere ser mejorada. [86]

3.2.3. Efectos adversos asociados a la terapia CART

Los eventos adversos asociados a la terapia CART guardan relación con el sistema inmunitario, a saber:

- a) La citotoxicidad *on-target/off-tumor*, que tiene lugar cuando el antígeno objetivo no sólo está presente en el tumor, sino también en tejidos sanos, o cuando una proteína con una región expuesta similar en secuencia al epítipo objetivo del CAR está presente en el cuerpo. En el caso de la terapia CART19, todos los pacientes experimentan aplasia de células B. [95]
- b) Las toxicidades *on target/on tumor* desencadenadas por el potencial citotóxico de las células T, que involucran el síndrome de liberación de citocinas (CRS) y el síndrome de lisis del tumor. [96]
- c) El rechazo mediado por el huésped tras recibir células T de donantes con diferente HLA y la enfermedad de injerto contra el huésped. [97]

-Síndrome de liberación de citocinas (CRS):

Es el efecto adverso más frecuente después de la infusión de células CART (puede parecer dentro de las primeras 24 horas después de la administración, aunque también se ha visto una aparición más tardía) y obedece a la expansión y activación inmune progresiva. La irrupción de los CARs con elementos de señalización coestimuladores (CARs de segunda y tercera generación) se tradujo en mejoras formidables de las respuestas antitumorales en pacientes con neoplasias hematológicas malignas; sin embargo, también se transformó en una amenaza tras observarse que la administración de células CART puede conducir a un CRS impresionante capaz de poner la vida en peligro. Es una respuesta inflamatoria sistémica provocada por la elevación de los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ , GM-CSF, MCP-1 y MIP-1 β . El CRS varía de leve a grave y las características clínicas incluyen fiebre alta, malestar general, fatiga, mialgia, náuseas, anorexia, taquicardia/hipotensión, filtración capilar, disfunción cardíaca, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y coagulación intravascular diseminada. Se ha demostrado que el grado de severidad se correlaciona con la carga de la enfermedad al momento de la infusión, observándose que los pacientes con una carga tumoral alta experimentan CRS más graves. Para manejar los síntomas fisiológicos de esta inflamación descontrolada sin atenuar la eficiencia antitumoral de las células CART, se requiere el uso acotado de corticoesteroides sistémicos y de bloqueadores del receptor de IL-6 (IL-6R), como tocilizumab y alternativamente de siltuximab o sarilumab, los que son capaces de revertir casi inmediatamente el CRS. Con éxito similar se ha utilizado también anakinra, un bloqueador de IL-1 [98, 99, 100]. Adicionalmente, se ha visto que las complicaciones tipo CRS pueden estar vinculadas a la dosis de células CART, por lo que ajustar la dosis a la carga de la enfermedad podría ser una estrategia plausible para minimizar esta toxicidad. Al respecto, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación logró determinar que la administración fraccionada de células CART19 (células ARI-0001) puede reducir la incidencia de CRS severo en pacientes con neoplasias hematológicas malignas CD19+ [101].

-Aplasia de células B:

Tras la administración de las células CART19, todos los pacientes experimentan un agotamiento del repertorio de células B casi completo (aplasia de células B). Esta toxicidad *on target/off tumor* es debida a que el CD19 se expresa en la mayoría de las neoplasias malignas de células B, pero también en células B normales, por lo que la respuesta de las células CART elimina igualmente a estas últimas. Este efecto adverso requiere la administración de gammaglobulina combinada y profilaxis antibiótica para evitar complicaciones infecciosas, hasta la recuperación de las células B. Si bien esta terapia de reemplazo de inmunoglobulinas resulta efectiva para enfrentar esta complicación, su costo es alto y podría causar una escasez del suministro si la terapia CART19 se transforma en un tratamiento común. [52]

-Toxicidad neurológica:

Este efecto adverso conocido también como ICANS (*immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*), ocurre más comúnmente en pacientes que reciben células CART19 y a menudo acompaña y se correlaciona con el CRS. Cursa con letargia, disfagia, afasia expresiva y mioclonía; estos síntomas pueden progresar a afasia global, confusión, delirio, convulsiones, obnubilación, estupor y coma. La fisiopatología causal es desconocida y una toxicidad directa de las células CART19 sobre el SNC no ha podido ser demostrada. Pareciera que las células CART que utilizan dominios coestimulatorios CD28 presentan un mayor riesgo de desarrollar ICANS, aunque las razones no están claras. Estudios en animales y datos de ensayos clínicos han evidenciado que las células mieloides pueden tener un papel en el desarrollo de ICANS tras la administración de células CART, al observarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR) infiltración de células mieloides y niveles elevados de citocinas derivadas de estas células, como IL-1, IL-6, GM-CSF, MCP-1, IP-10 e IL-8. Esto puede explicarse a través de la capacidad que tienen estas citocinas de impulsar la inflamación sistémica que conduce a alteraciones de la barrera hematoencefálica, lo que permite que el LCR quede expuesto a tales citocinas y ello provoque las posteriores disfunciones del SNC. En la mayoría de los casos esta complicación ha sido reversible con tratamiento y para su manejo se recurre principalmente a corticoesteroides en dosis altas. Además, a modo de profilaxis, muchos centros utilizan el anticonvulsivo levetiracetam al primer día de infusión de células CART [52, 98, 102]. Por otro lado, dada su estrecha correlación con el CRS, se ha demostrado que el manejo terapéutico de dicha complicación resulta ser también efectiva para ICANS, de modo que la utilización de fármacos como anakinra y tocilizumab han evidenciado resultados prometedores en la prevención y el tratamiento de esta neurotoxicidad [99, 100, 101].

-Síndrome de lisis del tumor (TLS):

Esta complicación es debida a la destrucción masiva de células malignas, las cuales liberan potasio, fósforo y ácidos nucleicos al torrente sanguíneo, provocando un desequilibrio del metabolismo. Como consecuencia puede sobrevenir insuficiencia renal aguda, insuficiencia respiratoria o incluso la muerte. Existen tratamientos efectivos para manejar los efectos del TLS, resultando una manifestación reversible en la mayoría de los casos. Por otro lado, se ha visto que la infusión de las células CART con quimioterapia de acondicionamiento previa está asociada a una menor aparición de TLS comparado con los regímenes que no la contienen. [52]

-Síndrome de activación de macrófagos/linfocitosis hemofagocítica (MAS/HLH):

En raras ocasiones, el CRS puede evolucionar hacia el síndrome de activación de macrófagos/linfocitosis hemofagocítica (MAS/HLH). Este síndrome se caracteriza

por una activación inmunitaria grave que cursa con fiebre alta, hepatoesplenomegalia, disfunción hepática/renal, coagulopatía, citopenias, hiperferritinemia, hipertrigliceridemia, con evidencia de hemofagocitosis e infiltración de tejido linfohistiocitario. [52, 98]

3.2.4. Avances y desafíos de la terapia CART en el tratamiento de las neoplasias malignas de células B

Si bien el enfoque CART19 es el más utilizado para neoplasias malignas de células B, se están desarrollando cada vez más CARs que se dirigen a otras moléculas. Así, las células CART anti-BCMA (antígeno de maduración de células B, que se expresa en la mayoría de las células del mieloma múltiple) han demostrado en ensayos clínicos tasas de respuesta de 80%, con casi la mitad siendo RC, en pacientes con mieloma múltiple refractario, demostrando un gran potencial como tratamiento para pacientes en recaída y refractarios [103]. Esto ha motivado a nuestro grupo de investigación a desarrollar un producto de células CART de segunda generación autólogo lentiviral y académico dirigido a BCMA (ARI0002h), el cual está siendo probado actualmente en el ensayo clínico multicéntrico CARTBCMA-HCB-01 (NCT04309981) en pacientes con mieloma múltiple en R/R. Los resultados obtenidos a la fecha muestran un perfil de eficacia y de seguridad favorables, con respuestas profundas y duraderas, junto a la ausencia de neurotoxicidad y la viabilidad de una segunda dosis de refuerzo [104, 105].

A pesar del éxito clínico obtenido con CART19 y CART-BCMA, actualmente casi el 50% de los pacientes no se benefician de esta terapia, ya sea porque son refractarios o recaen. Esta resistencia a la terapia puede deberse a la evasión del tumor, debido a una expresión disminuida o ausente de CD19 en la superficie de las células neoplásicas (mecanismo conocido como “pérdida de antígeno”) o por señales/vías inhibitorias que están activas en estas células o que derivan del TME. También se ha identificado que dicha resistencia puede obedecer al fracaso de las células CART, ya sea por su destrucción por parte del sistema inmune del paciente, por mala aptitud (capacidad/expansión deficiente) o por insuficiente coestimulación [64, 66, 87, 98].

Queda de manifiesto que las células CART deben enfrentar una serie de desafíos para mejorar su efectividad y superar las limitaciones actuales. Así, una serie de innovaciones en la ingeniería de las células CART han nacido para abordar importantes limitaciones, incluidas las toxicidades asociadas a las células CART que amenazan la vida, el escape de antígenos, el pobre tráfico e infiltración tumoral, la eficacia limitada contra los tumores sólidos, la inhibición y la resistencia en las neoplasias malignas de las células B, la persistencia limitada y el TME inmunosupresor [106]. Si bien hasta la fecha aún no existen terapias aprobadas para la prevención de las limitaciones anteriores, a continuación se exponen las nuevas estrategias para mejorar la eficacia clínica y superar las limitaciones de la terapia con células CAR-T en neoplasias malignas hematológicas de células B.

La principal causa de recaída posterior a la administración de las células CART19 es la expresión disminuida o ausente de CD19 en las células tumorales. Para disminuir la incidencia de escape de antígeno, se han desarrollado enfoques combinatorios y terapias dirigidas a marcadores alternativos, que han demostrado tasas de remisión prolongadas y duraderas en varios ensayos clínicos. Más específicamente, los resultados preliminares de ensayos clínicos que prueban la terapia con células CART dirigidas a CD19 y CD22 (CD19/CD22) han mostrado una eficacia prometedora en niños y adultos jóvenes con B-ALL y DLBCL, demostrando una actividad antileucémica comparable a CART19 [106, 107, 108, 109]. Otros enfoques duales incluyen un CAR dirigido a CD19/CD123, el cual ha mostrado en estudios pre-clínicos respuestas eficaces mientras se previene el escape de antígenos negativos [110, 111]; otro a CD19/CD20, cuyos resultados en un ensayo clínico fase I evidenciaron una tasa de respuesta objetiva de 91% con una RC de 82% [112]; mientras que las nuevas construcciones dirigidas a CD19/CD37 y a CD19/CD79b están actualmente en investigación, mostrando a la fecha una actividad sustancial contra células neoplásicas de linaje B [113, 114, 115]. Por otro lado, los resultados preliminares de los CAR dirigidos a BCMA/CD19 en el tratamiento del mieloma múltiple también han demostrado ser altamente eficaces con perfiles de seguridad favorables [106].

Otros objetivos CART para B-ALL que se encuentran en estudio incluyen al receptor TSLPR (receptor de linfopoyetina del estroma tímico), cuya sobreexpresión ocurre en un subgrupo de adultos y niños con B-ALL y confiere alto riesgo de recaída [116]; y el antígeno CD123 [117]. En el caso de la terapia CART para mieloma múltiple, se ha visto expresión variable de BCMA y también hay alguna información de pérdida de antígeno, lo que ha motivado la búsqueda de otros antígenos candidatos. Se están probando en ensayos clínicos células CART dirigidas a CD19 [118], a la cadena κ de la IgG (IgG- κ) [119], CD138 [120] y SLAMF7 [121]; mientras que otros antígenos propuestos, como CD38, se encuentran en evaluación [122]. Si bien la mayoría de estos enfoques muestran resultados positivos, la pérdida de antígeno posterior al tratamiento con células CART sigue suponiendo una dificultad, como ha quedado de manifiesto con CART22, donde se ha observado un patrón de recaída similar a CART19 con una expresión de CD22 disminuida en una mediana de 6 meses [107].

Las recaídas también pueden ser debidas a la corta persistencia de las células CART. Se ha podido establecer que la corta persistencia de las células CART obedece a que los CARs que actualmente se usan en la clínica contienen scFv murinos, lo que podría conducir a una mayor inmunogenicidad e incremento de las tasas de rechazo. Por lo tanto, puede resultar ventajoso utilizar fragmentos de anticuerpos humanos o humanizados en lugar de scFvs derivados de murinos para disminuir la inmunogenicidad del CAR [106]. El enfoque huCART19, un producto CART19 que incorpora un scFv humanizado, ha demostrado en un ensayo clínico aplicado a niños y adultos jóvenes con B-ALL R/R una alta tasa de respuesta, persistencia a largo plazo y remisiones duraderas, incluso en aquellos pacientes que anteriormente recibieron tratamiento con células CART19 [123]. Por otro lado, se ha visto que la modificación de los dominios bisagra

y/o transmembrana también logra disminuir la inmunogenicidad del CAR y mejorar la persistencia de las células CART [106].

El desarrollo de plataformas que utilizan células CART alogénicas han abierto una esperanza para aquellos pacientes que no pueden recuperar la aptitud de las células T, ya sea por enfermedad o por terapias anteriores; a la vez que ofrecen un acceso al tratamiento más rápido, productos más sanos, menor riesgo de contaminación con células neoplásicas, capacidad de redosificación, y potencialmente menores costos [87, 98]. Estos productos requieren de la eliminación del TCR endógeno mediante edición génica para prevenir la enfermedad de injerto contra el huésped. Los ensayos clínicos con este enfoque, conocido como UCART19, se han basado en células T alogénicas que expresan un CAR anti-CD19 y donde tanto el TCR como el CD52 son eliminados (este último para permitir la linfodepleción a través de un anticuerpo monoclonal anti-CD52). Su aplicación en el tratamiento de B-ALL R/R, así como de LBCL y FL R/R han mostrado altas tasas de respuesta y si bien estos resultados son muy esperanzadores, el posterior rechazo de estos productos por parte del huésped continúa siendo una de las complicaciones que limita su eficacia [97, 124, 125].

Recientemente, los esfuerzos se han centrado en diseñar CARs que sean resistentes a factores inmunosupresores en el TME hostil o que proporcionen señales inmunoestimuladoras en forma de citocinas estimulantes capaces de aumentar la supervivencia, la proliferación, la actividad antitumoral de las células T y de reequilibrar el TME. Los enfoques basados en CARs “blindados” se encuentran en investigación activa y buscan optimizar la terapia, mejorando la expansión/persistencia de las células CART y el reclutamiento de otras células en el TME, aumentando así su capacidad para funcionar en un TME inmunosupresor y reduciendo la toxicidad sistémica. Los estudios pre-clínicos ya han demostrado que la optimización de células T con CAR de segunda o tercera generación con modificaciones genéticas adicionales, tales como IL-12, CD40L o 4-1BBL, logran una mejor erradicación de las células B neoplásicas y una mayor persistencia de las células T. Aunque estos resultados pueden servir como prueba de principio, los mismos no serán concluyentes en cuanto a su eficiencia y éxito hasta saber lo que arrojarán los ensayos clínicos en curso [126, 127, 128, 129]. La combinación de células CART con terapia de bloqueo de puntos de control es otra de las estrategias de inmunoterapia que apunta a combatir la señal inhibitoria presente en el TME, ya que proporciona una fuerte respuesta inmunitaria. Así, se observó que el bloqueo de PD-1 combinado con la terapia con células CAR-T CD19 en niños con B-ALL muy pretratados resultó en una mejor persistencia de las células CART y mejores resultados [106].

Las toxicidades y las tasas de respuesta de la terapia CART son consideraciones determinantes para obtener resultados exitosos. Una de las rutas para optimizar la eficacia y limitar la toxicidad es mediante la alteración de componentes de la estructura modular del CAR. Se ha demostrado que modificando las regiones bisagra y transmembrana se puede modular la secreción de citocinas a través de células CART

activadas. Esto ha quedado en evidencia con un CAR dirigido a CD19, donde la modificación de las secuencias de aminoácidos de los dominios transmembrana y bisagra derivadas de CD8 α condujo a niveles más bajos de liberación de citoquinas y a una disminución de la proliferación de las células CART, obteniéndose como resultado una remisión completa en el 54,5 % de los pacientes con linfoma de células B con ausencia de eventos CRS o ICANS de grado > 1 en un ensayo clínico de fase 1 [130]. Otra de las regiones modificables del CAR es el dominio coestimulador, de modo que los dominios 4-1BB producen menos toxicidad y pueden ser especialmente útiles cuando hay una alta carga de enfermedad y/o un tumor con alta densidad de antígenos, mientras que los dominios CD28 pueden ser necesarios para alcanzar el umbral de activación de células T requerido en las situaciones donde se presenta una baja densidad de antígeno de superficie total y/o un dominio de unión al antígeno CAR de baja afinidad [106].

Otra vía para abordar los problemas de toxicidad de las células CART es mediante la implementación de "interruptores moleculares" o estrategias de genes suicidas, que poseen la capacidad de disminuir selectivamente las células T transducidas a través de un agente inductor secundario. Los genes suicidas son elementos codificados genéticamente integrados en las células CART que permiten la eliminación de las células introducidas en caso necesario y que se activan con la administración de un agente farmacéutico. Estos genes incluyen la caspasa 9 inducible (iCasp9), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncado (huEGFRt), la timidina quinasa del virus herpes simple (HSV-TK) y el CD20. El gen suicida probado con más frecuencia en la clínica es el que codifica para la iCasp9, el cual ha demostrado ser un sistema de apoptosis eficaz y seguro. El gen suicida incorpora la parte intracelular de la proteína Casp 9 humana y se fusiona con el dominio de unión a fármacos de la proteína FK506, teniendo esta última una alta afinidad por el inductor químico de dimerización AP1903. La proteína iCasp9 es sintetizada como homodímero y al administrar AP1903 se induce la dimerización y con ello la activación de la caspasa que conduce a la apoptosis de las células CART modificadas [131, 132]. Estudios pre-clínicos que combinan el gen iCasp9 con células CART anti-CD19 o anti-CD20 mostraron resultados alentadores y en base a ello se iniciaron ensayos clínicos en pacientes con B-ALL R/R y con linfomas de células B R/R. Estos han ido demostrando que la tecnología CART-iCasp9/AP1903 es un sistema eficaz y seguro, capaz de destruir rápidamente las células CART en caso de eventos adversos graves [133, 134].

En línea con lo anterior, resulta esencial disponer de una variedad de estrategias para controlar las células CART y así detener efectos adversos o toxicidades potencialmente mortales, o después de lograr la remisión para permitir un trasplante de células madres hematopoyéticas. Existen métodos existentes o emergentes basados en "interruptores moleculares", que incluyen a los CARs con interruptores de encendido y apagado (*ON-switch* y *OFF-switch* CARs), que han alcanzado gran interés al permitir que las células CART que cuentan con este sistema puedan activarse o desactivarse mediante la exposición a un medicamento, como puede ser la lenalidomida (fármaco de uso común contra el cáncer), demostrando ser seguros, rápidos, reversibles y clínicamente

adecuados para controlar la función transgénica [63]. Más recientemente, se han desarrollado varias estrategias moleculares para controlar las células CART de una manera espacio-temporal y no letal. Entre ellas destacan los SMASh-CARs (CARs de apagado asistido por moléculas pequeñas basados en proteasas o *protease-based small molecule-assisted shutoff* CARs), que también se denominan SWIFF-CARs (CARs con interruptor de apagado o *switch-OFF* CARs), un interruptor de apagado directamente integrado dentro de una construcción CAR que es controlado por un par proteasa/inhibidor de proteasa que permite inactivar rápida y reversiblemente las células CART mediante la administración del fármaco de pequeña molécula permeable a la célula Asunaprevir (ASN) [135]. Estos sistemas de interruptores de encendido y apagado podrían permitir en el futuro que los pacientes hagan una pausa temporal en su tratamiento con células CART para mitigar algunas de las toxicidades intensas. Con el mismo objetivo, otro de los enfoques con gran potencial desarrollados recientemente corresponde a los inhibidores de la tirosina quinasa, como el dasatinib, el cual es capaz de suprimir la activación de las células T mediante la inhibición de las quinasas de señalización del TCR proximal y que en modelos preclínicos ha demostrado que previene de manera rápida y reversible la activación de las células CART con una reducción significativa de CRS [136]. Si bien estas nuevas estrategias se encuentran aún en evaluación, sin duda abren el camino hacia el desarrollo de terapias más efectivas, seguras y complejas, donde la inhibición temporal de la función de las células CART podría permitir el rescate de la terapia una vez que hayan disminuido las toxicidades.

Las propuestas basadas en células CART que coexpresan de manera sintética mimotopos CD20 o la molécula completa de CD20 para su eliminación mediante anticuerpos monoclonales anti-CD20, han demostrado ser altamente efectivas. Así ha quedado en evidencia con el enfoque RQR8, un diseño de epítipo dual (con epítopos de CD34 y CD20) que otorga a las células CART una función como marcador de selección (cuando el CD34 es objetivo de un anticuerpo monoclonal anti-CD34) y como molécula suicida (cuando el CD20 es objetivo de rituximab), que ha demostrado una gran susceptibilidad a la lisis por rituximab [95]. Resultados similares se han obtenido con otros enfoques desarrollados posteriormente, como el CART123-CD20 en modelos preclínicos de leucemia mieloide humana, que ha mostrado una notable efectividad en el agotamiento de las células CART sin perjudicar la remisión de la neoplasia [137].

Todo lo anterior ha abierto las puertas al desarrollo de nuevas estrategias de depleción de células T que permitan aumentar la viabilidad de las terapias CART y es, en este contexto, que se desarrolla el presente trabajo. Basados en los trabajos realizados previamente por nuestro grupo de investigación, en especial el enfoque ARI-0001 [74] y los avances obtenidos por Daniel Segura en el marco de su trabajo de maestría [138], en esta tesis se desarrollan células T con un CAR específico para CD19 coexpresando la proteína de superficie CD20 (CART19-CD20). Aquí se muestra que las células CART-CD19 exhiben especificidad y una sólida actividad citotóxica y de citocinas *in vitro* contra células leucémicas B CD19+, así como una susceptibilidad a ser eliminadas rápidamente con el anticuerpo anti-CD20 rituximab. Este mecanismo contribuye al desarrollo de una

nueva estrategia para tratar neoplasias malignas de células B CD19+ que podría maximizar la eficacia terapéutica y superar posibles eventos adversos, como es la restauración de la población de linfocitos B normales tras la aplasia permanente que resulta de la persistencia de las células CART.

Hipótesis

Disponer de mecanismos de eliminación controlable de los CARTs (suicidio inducible) es un elemento que más allá de aportar opciones de seguridad a la terapia con CARTs, pues puede permitir poder eliminarlos si persisten más allá de lo necesario cuando el paciente esté libre de enfermedad (pero con hipogammaglobulinemia por delección de linfocitos B normales).

Nuestra hipótesis es que un CAR de cuarta generación con co-expresión de CD20 junto al CAR19 es capaz de permitir la destrucción de las células leucémicas CD19+, a induciendo la necesaria liberación de citocinas para su función y a la vez ser susceptible de ser erradicado con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (fármaco biológico rituximab principalmente).

2.- OBJETIVOS

1.- Objetivo general

Demostrar la capacidad citotóxica y de liberación de citoquinas de las células CART19-CD20 frente a linfocitos leucémicos CD19+, comprobando su susceptibilidad a depleción con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab.

2.- Objetivos específicos

- 1.- Diseñar el constructo CAR19-2A-CD20 y a través de su introducción en la zona de expresión del vector lentiviral pCCL, consiguiendo a su vez disponer de vectores lentivirales que permitan la transducción celular de linfocitos T.
- 2.- Modificar células T para que expresen simultáneamente un CAR dirigido hacia CD19 y el marcador de superficie específico CD20.
- 3.- Determinar la capacidad citotóxica de las células CART19-CD20 para destruir *in vitro* linfocitos B leucémicos CD19+ (células NALM6) e inducir la liberación de citocinas, comparando su actividad con las de las células CART19.
- 4.- Comprobar la capacidad del fármaco biológico rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) para producir la eliminación *in vitro* de las células CART19-CD20 a través del marcador de superficie CD20.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.1/ Digestión de los plásmidos recombinantes con endonucleasas de restricción

Alícuotas de las construcciones pCCL-CAR19 y pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20, a las que previamente se les determinó su concentración de DNA, se almacenaron a -20°C hasta su uso. Con el fin de digerir los plásmidos para liberar los fragmentos y exponer así los sitios de unión de los *primers*, ambos vectores fueron sometidos a la acción de endonucleasas de restricción específicas antes de ser utilizados como DNAs templados en las correspondientes PCRs. De este modo, las enzimas BamHI y XbaI fueron empleadas para el pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20, permitiendo liberar un fragmento que contenía la secuencia del 2A-CD20 (**Figura 3.2A**); mientras que en el caso del pCCL-CAR19 se recurrió a MluI y BstBI para obtener un fragmento que portaba la secuencia del CAR19 (**Figura 3.2B**).

Todas las enzimas utilizadas fueron adquiridas a New England Biolabs. El procedimiento para las digestiones enzimáticas se resume en:

- (a) Reacción: 1 µg de DNA plasmidial + 1 µL (10 U) de cada endonucleasa + 5 µL de buffer CutSmart® 10X + H₂O estéril libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 50 µL.
- (b) Se incubó por 1 h. a 37°C. El control negativo usado correspondió a la misma reacción sin añadir las enzimas (no fue necesaria segunda digestión añadiendo enzima y reincubando otra hora).

La correcta digestión de las enzimas de restricción fue confirmada a través de electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X.

1.2/ PCR convencional

La primera estrategia fue intentar generar el constructo pCCL-CAR19-2A-CD20, amplificando por PCR convencional la secuencia 2A-CD20 a partir del fragmento liberado por digestión del pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 (**Figura 3.2A**), para luego adjuntar dicho segmento amplificado al vector pCCL conteniendo el CAR19 (**Figura 3.3**). Se introdujo sitios de restricción flanqueando la secuencia de DNA, tanto en los extremos 5' como 3', para la enzima BstBI (TT/CGAA), la que coincide con la diana de restricción existente en el vector y para ello se usaron un par de cebadores (*primers*) específicos que contenían tal secuencia más 6 nucleótidos aleatorios al final para garantizar el buen funcionamiento de la enzima de restricción una vez que este producto de PCR sea digerido (**Tabla 3.1**). Los cebadores fueron diseñados y luego adquiridos de Integrated DNA Technologies (IDT).

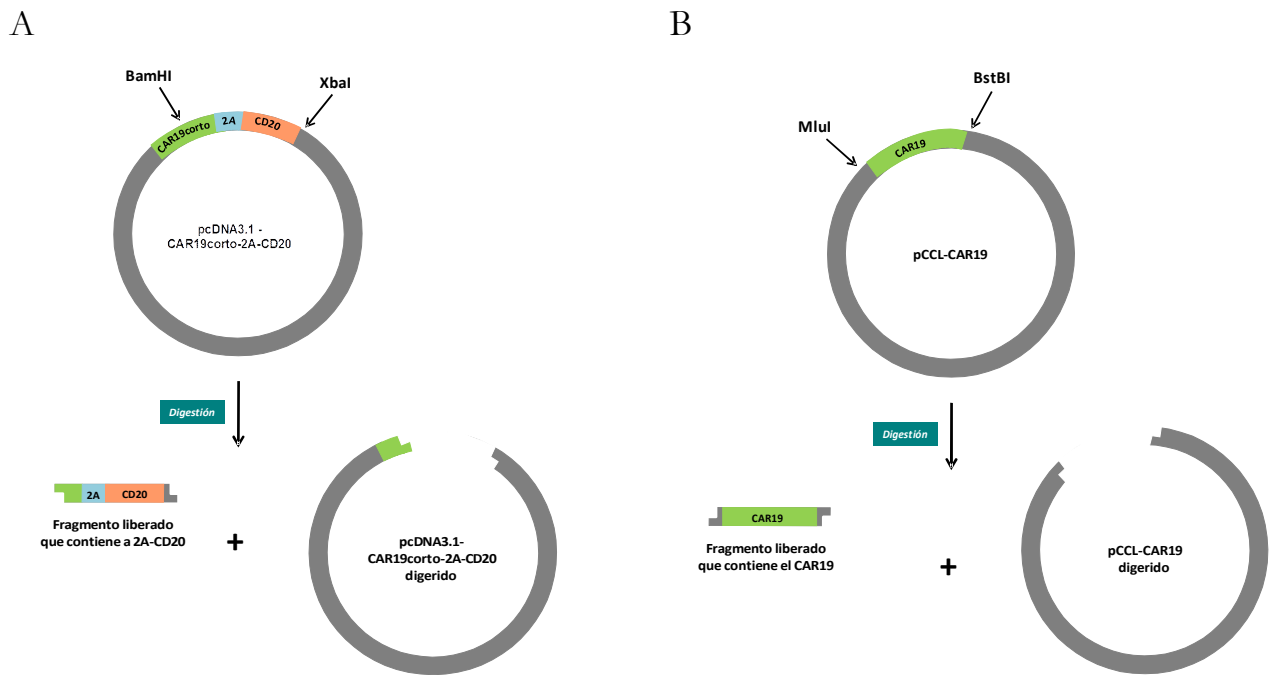


Figura 3.2: Digestión del vector pcDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 con las endonucleasas de restricción BamHI y XbaI (A) y del vector pCCL-CAR19 con MluI y BstBI (B).

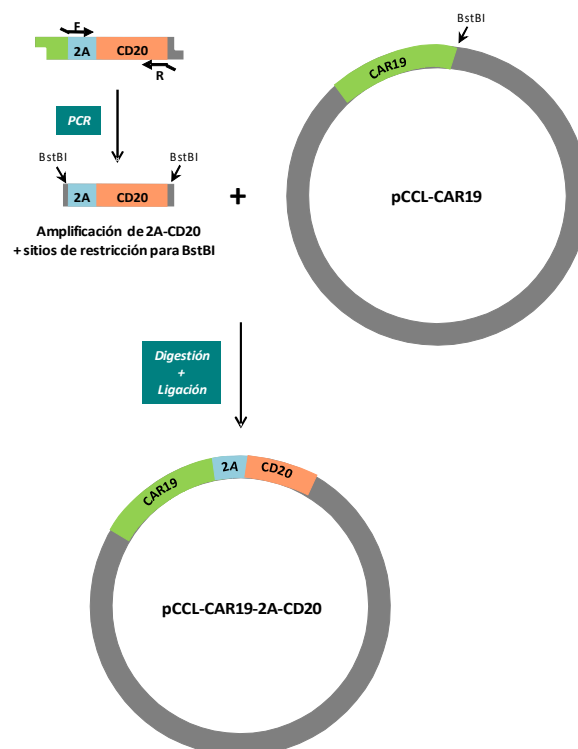


Figura 3.3: Estrategia para elaborar el constructo pCCL-CAR19-2A-CD20 a partir de la clonación de 2A-CD20 en el vector pCCL-CAR19. Mediante una PCR convencional se amplifica el fragmento 2A-

CD20 conteniendo en 3' y 5' secuencias para la endonucleasa de restricción BstBI, para que luego sea digerido y ligado al vector pCCL-CAR19.

Gen	Secuencia
2A-CD20	Cebador <i>forward</i> (F): GGTGGT ^T TTCGAACGTCGTCGTCGTGGA Cebador <i>reverse</i> (R): GAAT ^T TCTTTCGAATTAAGGAGAGCTGTC

Tabla 3.1: Secuencia nucleotídica de los cebadores F y R utilizados para amplificar el fragmento 2A-CD20 mediante PCR convencional.

En primera instancia, para la reacción se siguió el protocolo contenido en el kit de la DNA polimerasa utilizada (Phusion® High Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Cat.#M0530S):

4 µL del buffer Phusion® HF 5X +
0,4 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM) +
1 µL del *primer forward* (10 µM) +
1 µL del *primer reverse* (10 µM) +
12,9 µL de agua libre de nucleasas estéril +
0,5 µL del DNA molde-diana (1–4 ng) +
0,2 µL de Phusion® DNA Polymerase (1U/µL)
Volumen final de 20 µL

Como control negativo de la reacción de PCR fue llevada a cabo la misma reacción pero en ausencia de molde-diana.

El programa de amplificación en el termociclador Applied Biosystems® 2720 (AB Applied Biosystems) consistió en:

Desnaturalización inicial: 30 s a 98°C

30 ciclos de:

- Desnaturalización: 10 s a 98°C
- Alineamiento: 40 s a 60°C
- Extensión: 40 s a 72°C

Extensión final: 10 min a 72°C

Conservación: 4°C (tiempo indefinido hasta guardar o procesar la muestra)

Al no lograr amplificar el fragmento 2A-CD20 y teniendo en cuenta que los cebadores F y R comparten la secuencia de restricción para la enzima BstBI, induciendo

a que formen dímeros, y que además poseen un alto contenido CG, se decidió hacer algunas modificaciones con el fin de lograr el objetivo. Descartada la posibilidad de diseñar cebadores que difieran en su secuencia de restricción, se recurrió en la reacción PCR a incorporar DMSO (Dimetil Sulfóxido) al 2% y a reemplazar el buffer Phusion® HF 5X por el buffer Phusion® CG 5X (recomendado para alto contenido CG); en tanto que en el programa de amplificación del termociclador se probó aumentando el número de ciclos a 32 y 35, se experimentó con temperaturas de alineamiento en el rango 58 – 68°C y se prolongó el tiempo de elongación hasta 1 minuto.

Pese a probar con diferentes condiciones experimentales, fue imposible evitar la formación de dímeros entre los cebadores *forward* y *reverse* que impide su unión al DNA templado y con ello la amplificación. Esto condujo a realizar un segundo intento, ahora empleando otra variante de PCR.

1.3/ **Overlap-PCR**

Se usó como segunda estrategia la modalidad *Overlap-PCR*, la que buscó amplificar por pasos un fragmento comprendido desde la segunda mitad del CAR19 + 2A + CD20, para luego ser insertado a continuación de la primera mitad del CAR19 en el vector pCCL-CAR19 previamente digerido (**Figura 3.4**).

Los cebadores *forward* (F_mitC19l + MreI) y *reverse* (R_CD20 + BstBI) constan en 5' de 6 nucleótidos aleatorios, seguidos del sitio de restricción más 12 y 15 nucleótidos, respectivamente, complementarios con el inicio (desde segunda mitad del CAR19) y final de la secuencia a amplificar (hasta CD20). Los Oligos 1 y 2 están formados cada uno por 40 nucleótidos, el primero de ellos considera los 20 últimos nucleótidos del CAR19 (sin TAA) más los 20 primeros nucleótidos del 2A, mientras que el segundo contempla los 20 primeros nucleótidos del 2A más los 20 últimos nucleótidos del CAR19. Las secuencias se detallan en la **Tabla 3.2**. Los cebadores y oligos fueron diseñados y luego adquiridos en IDT.

Para las reacciones se utilizó el kit Expand® High Fidelity PCR System (Merck, Cat.#11732650001) y los controles negativos correspondieron a la respectiva reacción de PCR sin su molde-diana. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems® 2720 (AB Applied Biosystems). La evaluación y purificación de los productos de cada PCR se efectuó a partir de electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X.

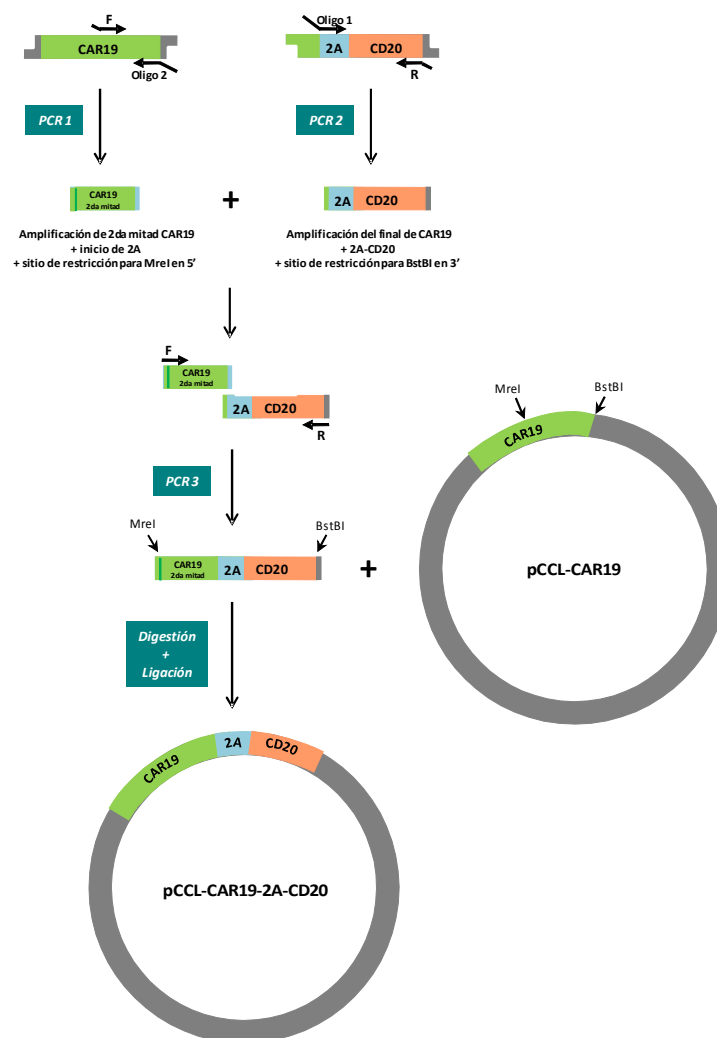


Figura 3.4: Estrategia para elaborar el constructo pCCL-CAR19-2A-CD20 a partir de la clonación del fragmento que comprende la segunda mitad del CAR19 + 2A + CD20 en el vector pCCL conteniendo la primera mitad del CAR19. Mediante *Overlap*-PCR se realizan tres amplificaciones en secuencia: la PCR1 amplifica la primera mitad del CAR19 + inicio de 2A + sitio de restricción para MreI en 5', la PCR2 amplifica el final del CAR19 + 2A-CD20 + sitio de restricción para BstBI en 3', y la PCR3 utiliza los productos de las PCR1 y PCR2 como plantillas para obtener así un fragmento que contenga la segunda mitad del CAR19-2A-CD20 flanqueado por sitios de restricción en 5' para MreI y en 3' para BstBI. La digestión de este fragmento y del vector pCCL-CAR19 con las mencionadas endonucleasas, seguido de su posterior ligación, permiten obtener el constructo pCCL-CAR19-2A-CD20.

Gen	Secuencia
CAR19 ^{2da mitad} + 2A + CD20	Cebador <i>forward</i> (F_mitC19I + MreI): GGTGGTTCGCCGGCGCCGAGACCACCT
	Cebador <i>reverse</i> (R_CD20 + BstBI): GAATTCCTTCGAATTAAGGAGAGCTGTC
	Oligo 1: TGCAGGCTCTGCCCCGCGGCGTCGTCGTCGTGGAGGAAG Oligo 2: CTCCTCCACGACGACGACGCCGCGGGGCGAGAGCCTGCA

Tabla 3.2: Secuencia nucleotídica de los cebadores y oligos específicos utilizados para amplificar el fragmento que comprende la segunda mitad del CAR19 y el CD20 mediante *Overlap*-PCR.

1.3.1) PCR 1

Se realizó la PCR1 utilizando como DNA templado el fragmento liberado por digestión del pCCL-CAR19 (**Figura 3.2B**) y como cebadores el *primer* F_mitC19I + MreI y el Oligo 2 (actúa como *reverse*) para amplificar la secuencia que incluye la primera mitad del CAR19 + inicio de 2A + sitio de restricción para MreI en 5' (**Figura 3.4**).

Para esta reacción las condiciones fueron las siguientes:

5 µL de buffer 10X con MgCl₂ 15mM +
1 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM) +
1 µL del *primer forward* (10 µM) +
1 µL del *primer reverse* (10 µM) +
15 µL de agua libre de nucleasas estéril +
1 µL del DNA molde-diana (1–4 ng) +
0,5 µL de MgCl₂ 25mM +
0,5 µL de Expand® High Fidelity Enzyme mix (3,5 U/µL)
Volumen final de 25 µL

El programa de amplificación en el termociclador:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

- Denaturación: 30 s a 94°C
- Alineamiento: 30 s a 60°C
- Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 7 min a 72°C

Conservación: 4°C (tiempo indefinido hasta guardar o procesar la muestra)

1.3.2) PCR 2

La PCR2 empleó como molde el segmento liberado por digestión del pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 (**Figura 3.2A**) y como cebadores el Oligo 1 (actúa como *forward*) y el cebador R_CD20 + BstBI para amplificar el fragmento que contiene el final del CAR19 + 2A-CD20 + sitio de restricción para BstBI en 3' (**Figura 3.4**).

Las condiciones de la reacción son idénticas a las de la PCR1 y el programa de amplificación en el termociclador fue el siguiente:

Denaturación inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

- Denaturación: 30 s a 94°C
- Alineamiento: 30 s a 62°C
- Extensión: 1 min a 72°C

Extensión final: 7 min a 72°C

Conservación: 4°C (tiempo indefinido hasta guardar o procesar la muestra)

1.3.3) PCR 3

Finalmente, se realizó la PCR3 para llegar a amplificar la secuencia buscada, consistente en la segunda mitad del CAR19 + 2A-CD20 flanqueada en los extremos 5' y 3' por los sitios de restricción para MreI y BstBI, respectivamente, para lo cual se consideró como moldes los fragmentos amplificados y purificados de las PCR1 y PCR2, y como cebadores los *primers* F_mitC19I + MreI y R_CD20 + BstBI (**Figura 3.4**).

Las condiciones para la reacción seguidas inicialmente se basaron en lo indicado por el protocolo del kit de Expand® High Fidelity PCR System (Merck):

5 µL de buffer 10X con MgCl₂ 15mM +
1 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM) +
1 µL del *primer forward* (10 µM) +
1 µL del *primer reverse* (10 µM) +
4 µL del producto de la PCR1 (1–4 ng) +
11 µL del producto de la PCR2 (1–4 ng) +
0,5 µL de MgCl₂ 25mM +
0,5 µL de Expand® High Fidelity Enzyme mix (3,5 U/µL) +
agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 µL

El programa de amplificación en el termociclador Applied Biosystems® 2720 (AB Applied Biosystems) fue:

Desnaturalización inicial: 2 min a 94°C

30 ciclos de:

- Desnaturalización: 15 s a 94°C
- Alineamiento: 30 s a 61°C

- Extensión: 3 min a 72°C

Extensión final: 7 min a 72°C

Conservación: 4°C (tiempo indefinido hasta guardar o procesar la muestra)

Tales condiciones experimentales no consiguieron amplificar el producto deseado, debido a la unión inespecífica de los cebadores F y R a los DNA templados, obteniéndose un amplímero que si bien su longitud es semejante a la de la secuencia buscada, su digestión con enzimas de restricción entregó un patrón de bandas no coincidente con el esperado. A raíz de lo anterior, el paso siguiente fue introducir modificaciones para intentar lograr el objetivo. Así, para inducir la correcta unión de los cebadores a los sitios diana y evitar con ello la amplificación inespecífica, se recurrió en la reacción PCR a añadir cantidades adicionales de MgCl₂ hasta obtener concentraciones finales entre 2 y 3 mM, se redujo la cantidad de cebadores añadiéndose 0,5 µL de cada uno y en el programa de amplificación del termociclador se probó aumentando de 32 - 35 el número de ciclos e incrementando la temperatura de alineamiento entre los 63 – 68°C.

Pese a incorporar estas modificaciones, fue imposible obtener la amplificación específica del target y por ello se envió a sintetizar el vector pCCL-CAR19-2A-CD20 a la empresa ProteoGenix para continuar con los objetivos propuestos.

1.4/ Electroforesis en geles de agarosa

Para la separación, visualización y purificación de los productos PCR, así como de los fragmentos obtenidos tras digestión con enzimas de restricción, se efectuó electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, incorporándose en él 6 µL de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Cat.#S33102) para teñir las bandas. En la preparación de las muestras, al DNA se agregó un volumen adecuado de BlueJuice® (Invitrogen, 10816015) como tampón de carga (10X) y luego se añadió al gel 10 – 15 µL de la mezcla/pocillo, incluyéndose como estándar de peso molecular el marcador de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Cat.#10787-026) y cargándose 5 µL/pocillo. A continuación, los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 170 voltios por 45 minutos en tampón TAE 1X. Tras ello, los fragmentos de DNA presentes en el gel fueron visualizados por exposición en transiluminador UV y para documentar los resultados éstos se fotografiaron.

1.5/ Purificación de DNA desde geles de agarosa

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis se purificaron utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Cat.#740609)

siguiendo las instrucciones del fabricante. Para liberar los DNAs que sirvieron de molde para la PCR3, las “bandas” correspondientes a los productos de amplificación de las PCR1 y PCR2:

- Se cortan desde el gel de agarosa y se pesan, para luego ser fundidos en el tampón de unión NTI (contenido en el kit, 30-45 % de tiocinato de guanidina) considerando la relación:
 - Para 100 mg de agarosa corresponden 200 μ L de tampón NTI, bajo una temperatura de 50°C por 10-15 min.
- Continuando con los pasos indicados en el kit, esta mezcla se coloca en una mini columna sobre una membrana de sílice, que retiene el DNA;
 - La columna es lavada con 700 μ L NT3 (tampón con 65-75% de etanol recientemente añadido) para remover la agarosa y los contaminantes y secada por una última centrifugación.
- Finalmente el DNA fue eluido en un volumen de 20 – 30 μ L μ L de NE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5; baja concentración de sal y ligeramente alcalino) y se determina su concentración por espectrofotometría (Nanodrop®, ver punto 1.10).

1.6/ Reconstitución del vector pCCL-CAR19-2A-CD20

El vector pCCL-CAR19-2A-CD20 adquirido comercialmente desde la empresa ProteoGenix®, disponible en forma liofilizada en una cantidad aproximada de 5 μ g, debió ser reconstituido previo a su utilización. Luego de centrifugar el tubo conteniendo el liofilizado a 11.000 rpm por 30 s, se resuspendió en 250 μ L de agua desionizada estéril. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 1 min, tras lo cual se aplicó vórtex por 10 – 15 s. seguido de 10 min de reposo (se repitió 2 veces). Se determinó su concentración (45 ng/ μ L) y se mantuvo almacenado a -20°C.

1.7/ Elaboración de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar

Para el cultivo bacteriano de *Escherichia coli* una vez transformadas con plásmidos (la transformación se describe en el siguiente punto), se requirió preparar previamente matraces con medio de cultivo líquido y placas con medio LB sólido. Para los primeros, se preparó 500 μ L a una concentración de 20 g/L de medio LB (Sigma-Aldrich, Cat.#L3522) utilizando matraces de Erlenmayer, los que fueron esterilizados a través de autoclave a alta presión.

Las placas LB-agar fueron preparadas utilizando la misma base anterior más 15 g/L de agar y luego de ser autoclavado el medio, se esperó que la temperatura de

redujera a aproximadamente 45°C para adicionarle el antibiótico ampicilina (Roche Diagnostics, Cat.#10835242001) a una concentración de 100 µg/mL (100 mL de medio LB + 200 µL de ampicilina en stock de 50 mg/mL), tras lo cual se agitó y se procedió a llenar con él placas Petri estériles de 10 cm de diámetro. Siguiendo las mismas concentraciones de medio de cultivo y de antibiótico usadas antes, se prepararon adicionalmente tubos con 5 mL de medio LB líquido + 10 µL de ampicilina del stock de 50 mg/mL.

Todos los medios de cultivo preparados se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

1.8/ Transformación de bacterias *E. coli*

Para la transformación se utilizó como células químicamente competentes las bacterias *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen, Cat.#C4040-10).

Siguiendo el protocolo del fabricante:

- Viales con 50 µL de estas bacterias fueron sacados de su almacenamiento a -80° C y se traspasaron a hielo hasta su descongelamiento.
- A cada vial se les agregó directamente 5 µL del plásmido pCCL-CAR19-2A-CD20 (45 ng/µL) y tras mezclar suavemente, fue dejada en hielo por 30 min.
- A continuación, los poros en la membrana de la bacteria fueron cerrados a través de *shock* térmico a 42° C por 30 s, para luego ser introducidas nuevamente en hielo.
- Con el fin de aumentar el número de bacterias y estabilizarlas después del shock térmico, las células transformadas fueron crecidas en 250 µL de medio de cultivo líquido S.O.C. (Super Optimal Broth: 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa, incluido en el kit) durante 1 h a 37°C con agitación constante a 250 rpm.
- Concluida la incubación, 200 µL de cada transformación fueron sembrados homogéneamente en las placas de LB-agar-ampicilina utilizando asa de rastrillo, para luego ser incubadas en estufa de cultivo bacteriano a 37°C durante toda la noche.
- Al día siguiente las colonias positivas fueron seleccionadas y luego crecidas en medio líquido LB con el fin posteriormente de extraer y purificar el DNA plasmídico.

1.9/ Purificación del DNA plasmídico

Las colonias de bacterias *E. coli* transformadas con el vector pCCL-CAR19-2A-CD20 fueron seleccionadas y sembradas en tubos con 5 mL de medio LB líquido + 10 μ L de ampicilina, para luego ser incubadas en estufa de cultivo a 37°C por 24 horas en agitación constante (200 a 250 rpm). Igual procedimiento se realizó para amplificar y purificar los plásmidos virales VSV-G, REV y RRE contenidos en *E. coli* almacenadas en viales con glicerol a -80°C, desde donde se extrajeron inóculos para sembrar los tubos que fueron luego incubados bajo las mismas condiciones.

Transcurrido lo anterior y tras evidenciar crecimiento microbiano, de cada tubo se sacaron 4 mL de la suspensión bacteriana para ser sembrados en respectivos matraces con 500 mL de medio líquido LB, los que se incubaron a 37°C por otras 24 horas en agitación constante.

Para la criopreservación de las cepas seleccionadas, al volumen del cultivo restante de cada tubo (1 mL) se le añadió igual volumen de una solución al 20% (v/v) de glicerol estéril y se almacenaron en crioviales a -80°C.

Las bacterias se cosecharon y se les extrajo el DNA plasmidial utilizando el kit Plasmid DNA purification Nucleo Bond® PC 500 (Macherey-Nagel, Cat.#740574), siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Se centrifugan las bacterias a 4500 x g por 15 min. a 4°C.
- Posteriormente los sedimentos se homogenizan en tampón de lisis para lograr la ruptura celular y la liberación del DNA plasmidial.
- Se aclaran los lisados mediante filtración, para luego ser cargados en columnas de intercambio iónico, sobre una resina de sílice que retiene el ácido nucleico.
- Se lavan las columnas con tampón alcohólico del kit.
- Se eluye el DNA usando el tampón N5 contenido en el kit.
- El volumen eluido se precipita con isopropanol y se centrifuga a 15.000 x g por 30 min. a 4°C.
- El *pellet* de DNA se lava con etanol 70% (centrifugando después del paso).
- Los tubos conteniendo los *pellets* de DNA se dejan secando por 10-20 min. a temperatura ambiente y luego se redisuelven añadiendo 100 μ L de agua libre de nucleases estéril.
- Concluida la purificación, se determina la concentración del DNA plasmídico y los microtubos se almacenan a -20°C hasta su utilización.

1.10/ Cuantificación de DNA

Para determinar la concentración del DNA de las diferentes muestras (productos de amplificación de las PCRs y DNAs plasmidiales) se empleó el espectrofotómetro NanoDrop® 1000 V3.7.1 (Thermo Fisher Scientific). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría, utilizándose 2 µL de volumen de muestra y midiéndose la absorbancia a 260 nm. (a esta longitud de onda se detectan las bases nitrogenadas del DNA), contra un blanco de agua libre de nucleasas (la solución utilizada para resuspender el ácido nucleico). Se verificó la calidad de las muestras y la ausencia de contaminantes a través del índice de pureza Abs_{260}/Abs_{280} proporcionado por el análisis del mismo instrumento. Un índice de 1,6 o mayor fue considerado.

1.11/ Diseño de cebadores y análisis de las secuencias nucleotídicas

Primer-BLAST: Con este programa se diseñaron los cebadores y oligos que se muestran en las tablas 3.1 y 3.2, obteniéndose valores de autocomplementariedad, T_m y % CG. Junto con lo anterior, también se realizó un análisis para detectar si dichos cebadores son complementarios a otras secuencias involucradas en la reacción de PCR. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.

Primer3Plus: Permite también diseñar y/o reconfirmar las características de los cebadores y oligos, chequear si su tamaño es adecuado y conocer su contenido CG y T_m ideal. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

Mfold: Se utilizó para predecir el plegamiento e hibridación de los cebadores diseñados, permitiendo visualizar el tipo de estructura secundaria susceptible de ser formada (autocomplementariedad). Se pusieron las secuencias de ambos cebadores por separado y de esta manera se pudo saber a qué temperaturas formaban estructuras secundarias. <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>.

OligoAnalyzer: Permite comparar ambos cebadores y oligonucleótidos para ver si hay complementariedad entre ellos (formación de dímeros de *primers*), indicando los lugares de unión, el número de bases unidas y el valor delta G. <http://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.

Chromas: Permite hacer la lectura de las secuencias luego del proceso de secuenciación.

ClustalW: Se utilizó para alinear dos secuencias que se encontraban en igual sentido de lectura. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

RestrictionMapper: Permite determinar los sitios de corte de enzimas de restricción en las secuencias analizadas. Se pusieron las secuencias a analizar y se pudo detectar cuáles son las enzimas de restricción que las cortan y los sitios en la secuencia donde lo hacen.

2.- Cultivos de células primarias y de líneas celulares

2.1/ Linfocitos T primarios

Derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas de *buffy-coats* de sangre proporcionados por donadores sanos. Los *buffy-coats* fueron obtenidos desde el Banc de Sang i Teixits. Las PBMCs se aislaron aplicando una centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Histopaque® (Sigma-Aldrich, Cat.#10771), siguiendo el protocolo señalado por el fabricante. De forma breve:

- Se depositan lentamente y con cuidado 18 mL de la muestra de sangre (o *buffy-coats*) una vez diluida con PBS (x2 para sangre, x4 para *buffy-coats*) sobre 7 mL de Ficoll-Histopaque situado en la base de un tubo de 25 mL transparente.
- Se centrifuga a x2.000 rpm durante 20 min.
- Se recoge con pipeta la capa de PBMCs en la interfase de ambas soluciones transfiriéndola a un nuevo tubo.
- Se diluye esta capa recogida con PBS al menos con el mismo volumen para centrifugarla con 1.300 rpm durante 10 min, obteniendo un botón celular (*pellet*) con las PBMCs.
- Tras descartar el sobrenadante, se realiza un lavado al menos, con más PBS (resuspendiendo el botón celular y recentrifugando). En este paso se aprovecha para contar el número de células para poder saber el volumen de resuspensión.
- Al final, se resuspenden las células en PBS o medio a la concentración de trabajo.

Para disponer de linfocitos T, los monocitos de los PBMCs fueron eliminados por adhesión a una placa Petri estéril tras incubación por 15 min a 37°C y 5% de CO₂, y las células que permanecieron en suspensión fueron centrifugadas a 1.300 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Cuando se decide proceder a cultivarlos, el botón celular se resuspenden en un volumen de 40 mL del medio de cultivo basal OpTmizer® + suplemento (Gibco, Cat.#A1048501), adicionado con 2,5% de suero humano AB (Sigma, Cat.#H4522), GlutaMAX-I® (200 mM; Thermo Fisher, Cat.#A12860), penicilina-estreptomicina (100 mg/mL) e IL-2 (300 UI/mL; Thermo Fisher, Cat.#CTP0023). Para continuar con su estimulación, transducción y expansión (descritos en detalle en la sección 6), es necesario efectuar un recuento y luego

determinar el volumen de células necesario, en general los linfocitos se cultivan en concentración de inicio de 800.000-1.000.000 células/mL.

2.2/ Líneas celulares

La línea celular NALM6 fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC; CRL-3273) y fue cultivada en medio RPMI (HyClone, Cat.#SH30027.01) + 10% de suero fetal bovino (FBS) + penicilina-estreptomicina (100 mg/mL) + 1% de MEM (Minimum Essential Medium) con NEAA (Non-Essential Amino Acids) (Gibco, Cat.#11140-035) y suplemento de Piruvato de sodio (1mM; Gibco, Cat.#11360-039).

La línea celular HEK293T también fue adquirida del ATCC (CRL-11268) y cultivada en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Cat.#41965-039) + 10% FBS + penicilina-estreptomicina (100 mg/mL) + 1% de MEM-NEAA + Piruvato de sodio (1mM) con HEPES (ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico) (10mM; Gibco, Cat.#15630-056).

Ambas líneas celulares, luego de hacerles recuento y revisar viabilidad con azul tripán, son cultivadas horizontalmente a 37°C y 5% de CO₂.

La densidad de la suspensión celular de NALM6 se debe mantener ajustada entre 2 a 8 x 10⁵ células viables/mL con adición o reemplazo de medio de cultivo fresco.

Al cultivo de células HEK293T, luego de alcanzar el 100% de confluencia, se le remueve y descarta el medio de cultivo para agregar 2 – 3 mL de una solución de 0,25% (p/v) de tripsina y 0,53 mM de EDTA. Se deja actuar por 3 a 5 min a 37°C. Cuando la capa celular se desprende y las células se dispersan, se agrega 6-8 ml de medio de cultivo suplementado con FBS y la suspensión celular es homogenizada pipeteando suavemente. Luego se efectúa un recuento y las alícuotas apropiadas se utilizan para los procedimientos siguientes, mientras que otras se destinan para mantener el cultivo, considerando para esta última un ratio de subcultivo de 1:4 con renovación de medio cada 2 a 3 días hasta alcanzar la confluencia del 100%.

3.- Transfección transitoria en células HEK293T

Se llevó a cabo transfección transitoria en células HEK293T con el fin demostrar la capacidad del plásmido vector pCCL-CAR19-CD20 para inducir la co-expresión del CAR19 y del CD20:

- Una suspensión de 200.000 células HEK293T fueron añadidas en cada pocillo de una placa P24 y completadas hasta 500 μ L con medio DMEM suplementado (se sembraron dos pocillos).
- Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ *overnight*.
- Al día siguiente se efectuó la transfección en las células de uno de los pocillos (el segundo pocillo se mantuvo como control negativo), la cual fue llevada a cabo utilizando Lipofectamine® 2000 (Life Technologies, Cat.#11668), siguiendo el protocolo del fabricante.
- Realizada la transfección, las células se cultivaron nuevamente *overnight* y luego de ser visualizadas por microscopía, se les efectuó un lavado y un cambio de medio de cultivo (el medio DMEM no suplementado necesario para la transfección debe reemplazarse por DMEM suplementado).
- Luego se incuban por otras 24 h en las mismas condiciones descritas.
- Finalmente, las células de ambos pocillos fueron separadas con solución de EDTA a 0,5 mM, mediante pipeteo arriba y abajo.
- Luego se disponen para ser analizadas por citometría de flujo: se utilizó un anticuerpo conjugado a alofococianina (APC) dirigido al scFv para detectar el CAR19, mientras que para el CD20 se recurrió a un anticuerpo anti-CD20 humano conjugado a ficoeritrina (PE) (ambos anticuerpos se especifican en la sección 7).

4.- **Producción lentiviral**

Para producir partículas lentivirales:

- Se comenzó plaqueando 22×10^6 células HEK293T en cada placa de 15 cm de diámetro. en un volumen final de 18 mL de medio DMEM suplementado (se sembraron seis placas) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas.
- Transcurrido ese período, las células HEK293T con una confluencia del 90% fueron transfectadas con el vector de transferencia pCCL-CAR19 o pCCL-CAR19-2A-CD20, según corresponda, junto con los plásmidos de empaquetamiento pMDLg-pRRE (Addgene, Cat.#12251), pRSV-Rev (Addgene, Cat.#12253), y un plásmido de envoltura pMD2.G (Addgene, Cat.#12259), utilizando Polietilenimina (PEI) lineal de peso molecular 25 KDa (Polysciences, Cat.#23966-1).
- Para el procedimiento de transfección, primeramente se retiró 2 mL de

medio de cultivo de cada placa P15 y luego se preparó en un tubo de 50 mL los DNA plasmídicos a utilizar, considerando para cada placa 18,63 µg del vector de transferencia, 9,18 µg de pMDLg/pRRE, 4,59 µg de pRSV-Rev y 6,4 µg de pMD2.G, los que fueron resuspendidos en DMEM libre de suero.

- A este mix se le adicionó gota a gota 94,5 µg de PEI 1mg/mL mezclando mediante vórtex, tras lo cual se incubó por 20 min a temperatura ambiente.
- Transcurrido ese período y luego de agitar nuevamente por vórtex, la suspensión de PEI y DNAs (1 mL) fue añadida gota a gota a cada uno de los cultivos celulares con 16 mL de DMEM completo.
- Tras 4 – 6 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂, el medio de cultivo fue reemplazado por 20 mL de DMEM suplementado y se mantuvo el cultivo en las mismas condiciones.
- Pasadas 48 h de incubación, los sobrenadantes virales fueron colectados y a las placas se les añadió 16 mL de medio para mantener el cultivo por otras 24 h más, tras lo cual se realizó una nueva recolección.
- Los sobrenadantes virales obtenidos a las 48 y 72 h fueron primeramente clarificados por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. y luego filtrados utilizando un filtro de 0,45 µm.
- Posteriormente éstos fueron traspasados a tubos de centrifuga pre-esterilizados Ultra-Clear® (Beckman Coulter, Cat.#344058) y concentrados mediante ultracentrifugación a 26.000 rpm a 4°C en un rotor SW 32 Ti por 2 horas 30 min., utilizando para ello la ultracentrífuga Beckman Optima® X (Beckman Coulter).
- Una vez concluido el proceso, se removieron los sobrenadantes por inversión de los tubos y el *pellet* de cada tubo se resuspendió en 100 µL del medio de cultivo OpTmizer® suplementado, para luego reunir todos los volúmenes en un solo tubo para mejorar la concentración.
- Tras ello se hicieron alícuotas de 100 µL que se almacenaron en criotubos a -80°C.

5.- Titulación lentiviral

Para determinar el número de unidades de transducción (TU/mL) se optó por el método de dilución limitante:

- El primer paso fue sembrar 250.000 células HEK293T en cada pocillo de una placa P24 en un volumen de 1 mL de medio DMEM suplementado (se sembraron 6 pocillos) e incubarlas por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

- Al día siguiente se tripsinizaron y contaron las células del primer pocillo para determinar el número de células a transfectar y acto seguido, se procedió a realizar la infección en los siguientes cuatro pocillos.
- En un pocillo se añadió sobre las células en DMEM completo 40 µL del sobrenadante viral concentrado y luego a partir de éste se prepararon diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, de las cuales se agregó también 40 µL a cada pocillo. El último pocillo se dejó sin infectar (control).
- Se agregó a todos los pocillos polibreno (Millipore, Fisher Scientific, Cat.#12965169) a una concentración final de 8 µg/ml.
- Se incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h, tras lo cual se procedió a cambiar el medio de cultivo y se mantuvo el cultivo por otras 24 horas en las mismas condiciones.
- Transcurrido ese período, las células fueron tripsinizadas, extraídas y preparadas para ser analizadas por citometría de flujo, utilizando el anticuerpo para detectar el CAR19 especificado en la sección 7.
- Obtenidos los resultados de citometría de flujo, se calculó el título viral utilizándose la dilución correspondiente al 2%–20% de células CAR19 positivas, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Título (TU/ml)} = \frac{N \times P}{V \times D}$$

N = Número de células en cada pocillo usado para infección
P = Porcentaje de células positivas por el CAR19 (2% ~ 20%)
V = Volumen (mL) del virus usado para la infección en cada pocillo
D = Factor de dilución
TU = Unidades de transducción

Esquema 3.1: Calculo del titulo viral

A partir de las TU se puede definir la M.O.I. (*Multiplicity of Infection*) por el número de partículas que se necesitan usar para transducir una célula.

6.- Estimulación, transducción y expansión de linfocitos T primarios humanos

Los linfocitos T fueron obtenidos a partir de PBMCs como se detalló en la sección 2 y estas células fueron activadas, transducidas y expandidas *in vitro*, para luego ser analizadas por citometría de flujo con el fin de testear la expresión del CAR19 y del CD20 sobre su superficie:

- En pocillos de placa P24, alícuotas de 1.000.000 de células frescas contenidas en 1 mL de medio OpTmizer® completo fueron activadas y

expandidas con microesferas (*beads*) conjugadas con mAbs anti-CD3 y anti-CD28 (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28; Gibco, Cat.#11131D) en una razón beads/células de 3:1, en presencia de IL-2 (Thermo Fisher, Cat.#CTP0023) a una concentración final 30 U/mL.

- Tras una incubación de 24 h a 37°C y 5% de CO₂, las células fueron transducidas con los lentivirus que contenían los vectores pCCL-CAR19 o pCCL-CAR19-2A-CD20, según corresponda, utilizando una MOI de 10 o 20, dependiendo del nivel de expresión que se deseaba obtener.
- Una vez infectadas las células, se incubaron por 48 h en las condiciones ya descritas y transcurrido ese período se les agregó medio de cultivo sobre el medio ya existente en una cantidad equivalente a 3/4 del volumen inicial (las células al estar resuspendidas en 1 mL se les añadió 750 µL de medio) y se les adicionó IL-2 en la misma proporción utilizada anteriormente.
- Se mantuvo el cultivo y la expansión con las beads por 48 – 72 h más, tras lo cual se llevó a cabo el *debeading*, transfiriendo para ello todo el contenido de los pocillos a tubos, los que fueron incorporados a un imán para lograr que las beads queden adheridas y poder así retirar el medio de cultivo con las células en suspensión.
- Se procedió a realizar un recuento celular y a ajustar a 800.000 a 1 millón de células/mL (máx. 1,2 millones/mL), añadiendo la cantidad de medio de cultivo apropiado y traspasándolas al contenedor que corresponda (placas o frascos), manteniendo la presencia de IL-2 en las concentraciones indicadas.
- Estas condiciones se mantuvieron por todo el período de expansión celular, que se prolongó por 8–10 días más, durante el cual diariamente se efectuaron recuentos y se hicieron los ajustes correspondientes hasta disponer del número de células requeridas para proseguir con los experimentos.
- En diferentes puntos dentro del proceso, alícuotas de células fueron analizadas por citometría de flujo con el fin de testear el nivel de expresión del CAR19 y del CD20 sobre la superficie celular.

7.- Análisis por citometría de flujo

La preparación de las células para ser analizadas por citometría de flujo se realizó como sigue:

- Comenzó con la extracción de alícuotas de la suspensión celular y su traspaso a tubos de citometría, seguido de 2 lavados con PBS 1X (en cada

lavado se añadieron 2 mL de PBS 1X a cada tubo y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se eliminó el sobrenadante).

- El botón celular se resuspendió en el fondo del tubo y se añadió el volumen apropiado del o los anticuerpos monoclonales correspondientes (1 – 5 μ L a cada tubo), seguido de una incubación por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Transcurrido ese período, se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones descritas y se eliminó el sobrenadante.
- Finalmente, las células son resuspendidas en un volumen adecuado del diluyente ISOTON® II (Beckman Coulter, Cat.#8546719), quedando listas para realizar la lectura en el citómetro de flujo.

La expresión del CAR19 fue detectado usando un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado a APC dirigido al scFv (Allophycocyanin-conjugated AffiniPureF(ab')₂ Fragment Goat anti-mouse IgG; JacksonImmunoResearch Laboratories®, Cat.#115-136-072), mientras que para la proteína CD20 se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-CD20 humano (BD Biosciences, Cat.#345793).

En tanto, para las pruebas de citotoxicidad y los ensayos de depleción con rituximab, se utilizaron los anticuerpos monoclonales contra las siguientes proteínas humanas, todos de BD Biosciences: CD4-BV421 (Cat.#562425), CD8-APC (Cat.#345775), CD19-PE (Cat.#561741), CD69-APC-Cy7 (Cat.#557756), CD3-APC (Cat.#345767) y como un marcador de viabilidad se utilizó el 7-AAD (Cat.#559925).

Las lecturas se realizaron utilizando el citómetro de flujo BD FACSCanto® II (BD Biosciences) y los datos fueron analizados usando el Software BD FACSDiva®. Para cada análisis se consideró un control de células no teñidas (*unstain*).

8.- Ensayo *in vitro* de citotoxicidad y de liberación de citocinas

Para evaluar *in vitro* la eficacia de las células CART19-CD20, CART19 y no transducidas por medio de pruebas de citotoxicidad y a través de la liberación de citoquinas, estos linfocitos se co-cultivaron con la línea celular de leucemia NALM6 (células *target* CD19+) por 4 y 16 h, a diferentes ratios efectoras: target (E:T). El procedimiento es como sigue:

- Se comenzó realizando un recuento de las células NALM6 y T (transducidas/no transducidas) mantenidas en cultivo.
- Luego de centrifugar el volumen necesario, se resuspendieron en medio OpTmizer® completo y las células NALM6 se ajustaron a una

concentración de 1×10^6 células/mL, mientras que las células T a 4×10^6 células/mL.

- En una placa de 24 pocillos se incorporó, en un volumen final de 1 mL, la cantidad de células T (CART19-CD20, CART19 o no transducidas) con las células NALM6 a los ratios E:T de 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 y 4:1, manteniendo un número fijo de células *target* (500.000 células) y considerando un pocillo con células NALM6 no tratadas (sin células T).
- Luego de una incubación a 37°C por 4 o 16 horas, se traspasó el contenido de cada pocillo a un microtubo y se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos, tras lo cual se recogió el sobrenadante y se guardó a -20°C para el posterior análisis de citocinas.
- Se resuspendió el *pellet* de células en 50 μ L de medio OpTmizer® completo, para luego ser transferidas a los tubos con *beads* para recuento absoluto de leucocitos TruCOUNT® (Becton Dickinson, Cat.#340334) y ser teñidas con los anticuerpos monoclonales para CD4, CD8, CD19, CD69 humano y 7-AAD.
- Para lo anterior, se añadió el mix de anticuerpos (preparada previamente en un volumen de 20 μ L) a cada tubo y tras agitar con vórtex durante 5 s, se procedió a una incubación por 15 min a oscuras.
- Transcurrido ese período, se adicionó 450 μ L de PBS a cada tubo y se procedió a la lectura en el citómetro.

Para el conteo absoluto de células, se adquirió el número fijo de *beads* de 10.000 en cada muestra y la citotoxicidad mediada por CART fue determinada calculando el porcentaje de células NALM6 sobrevivientes (CD19+/7-AAD-) en los diferentes ratios E:T y en cada punto de tiempo, con respecto al cultivo de NALM6 no tratado. Lo anterior permitió comparar el poder citotóxico de las células CART19-CD20 en referencia a las células CART19 y a las células T no transducidas.

Para evaluar y comparar la capacidad de los linfocitos CART19-CD20 y CART19 para inducir la liberación de citoquinas responsables de activar otros mediadores de la respuesta inmune, se efectuó un análisis de los niveles de las citocinas proinflamatorias INF- γ , IL-17a, IL-10, IL-1 β y IL-6 liberadas durante el co-cultivo de las células *target* con las CARTs. Éste se realizó a partir de los sobrenadantes colectados de los ensayos de citotoxicidad a los diferentes ratios E:T tras las 4 o 16 horas de incubación y la detección se llevó a cabo mediante la tecnología Luminex xMAP®, utilizando el panel MILLIPLEX® Human Cytokine Magnetic Bead (Millipore Merck, Cat.#HCYTOMAG-60K-05) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.- Ensayo de depleción con rituximab

Para comprobar si un anticuerpo monoclonal anti-CD20 es capaz de inducir la eliminación citotóxica de las células CART19-CD20 a través del marcador de superficie CD20, se evaluó su susceptibilidad a depleción *in vitro* administrando rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20). Este análisis se efectuó mediante un ensayo de 4 horas basado en citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), donde se evaluó la sensibilidad de los linfocitos CART19-CD20 al ser incubados frente a concentraciones crecientes de rituximab en presencia de complemento.

Tras estimar el nivel de expresión del CD20 en la superficie de los linfocitos CART19-CD20 mantenidos en cultivo:

- En una placa de 96 pocillos fueron sembradas 100.000 células/pocillo de células CART19-CD20 y células T no transducidas (control) en un volumen final de 100 μ L/pocillo utilizando medio OpTmizer® completo.
- A todas las células se les incorporó el complemento, añadiendo 25 μ L/pocillo de suero de conejo (25%) y luego se adicionó el rituximab (*Mabthera*; Roche) a las concentraciones de 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μ g/mL en los respectivos pocillos de las células CART19-CD20 y del control.
- Se mantuvo en cada grupo dos pocillos controles con células sin tratar, donde uno de ellos fue destinado para control *unstain*. Luego de la incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 h, se traspasó el contenido de cada pocillo a tubos de citometría y se prosiguió con la preparación de las células para su análisis; para esto, luego de realizar los 2 lavados con PBS 1X y exceptuando a los controles *unstain*, se marcaron los linfocitos CART19-CD20 y no transducidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Posteriormente, se lavaron una vez más con PBS 1X y acto seguido se marcaron con el 7-AAD y fueron incubados por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual quedaron preparados para ser analizados.

Teniendo presente el nivel de expresión del CD20 en los linfocitos CART19-CD20, las estimaciones de mortalidad fueron determinadas mediante análisis por citometría de flujo considerando el porcentaje de células vivas con respecto al total de linfocitos (CD3+) o el de las células muertas en base al porcentaje de linfocitos muertos (7-AAD+).

10.- Evaluación in vivo de la eficacia de CART19-CD20 y su eliminación con rituximab en un modelo de xenoinjerto de B-ALL

Para evaluar la eficacia *in vivo* de las células CART19-CD20, comparar su actividad citotóxica con las de las células CART19 y comprobar su susceptibilidad a ser deplecionadas con el anticuerpo anti-CD20 rituximab, se realizó un experimento de xenoinjerto de leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) humano en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rd^{tm1Wjl}/SzJ (NSG).

Ratones hembras de 3 meses de edad fueron asignados aleatoriamente en grupos en base a la administración de:

- Grupo N°1: Células NALM6 (n = 3)
- Grupo N°2: Células NALM6 + células T no transducidas (n = 3)
- Grupo N°3: Células NALM6 + CART19 (n = 3)
- Grupo N°4: Células NALM6 + CART19-CD20 (n = 4)
- Grupo N°5: Células NALM6 + CART19 + Rituximab (n = 4)
- Grupo N°6: Células NALM6 + CART19-CD20 + Rituximab (n = 4)
- Grupo N°7: Suero fisiológico (n = 1)

Como se esquematiza en la **Figura 3.5**, para inducir la enfermedad los animales fueron infundidos intravenosamente (IV) a través de la vena de la cola con 1×10^6 células/ratón de células tumorales NALM6-Luc + GFP + (CD19+) al día -7, excepto en el ratón control (infundido con suero fisiológico). El injerto de células NALM6 se detectó mediante imágenes de bioluminiscencia al día 0 y a los días 7, 11, 14, 21, 26 y 28 en todos los grupos de ratones tras la administración intravenosa de D-luciferina. Al día 1, los ratones pertenecientes a los grupos 2-6 fueron infundidos con las células T correspondientes en una cantidad de 5×10^6 células/ratón.

La progresión de la enfermedad fue observada durante un período de 2 semanas después de la infusión de células NALM6. Los animales pertenecientes a los grupos 1 y 2 fueron sacrificados a los días 11 y 12, debido a enfermedad progresiva.

Para depleccionar los linfocitos T, los animales de los grupos 5 y 6 fueron tratados con el anticuerpo anti-CD20 (Rituximab®) a una dosis de 1 mg/kg IP en el día 21.

Los datos de las imágenes de bioluminiscencia permitieron mostrar la capacidad de las células CART19-CD20 para eliminar las células tumorales e indicar si existen diferencias con la capacidad de las células CART19. Las imágenes de bioluminiscencia se cuantificaron usando ImageJ. La carga tumoral, la expansión o depleción de células T se midió mediante citometría de flujo en muestras de sangre tomadas sucesivamente a los días 11, 14, 21, 22, 24, 26 y 28, utilizándose para ello la tinción con anti-CD19 humano con el fin de detectar las células tumorales CD19+ en los diferentes grupos.

A causa de la prematura muerte de los animales por la rápida progresión de la enfermedad, sumado a la paralización debida a COVID-19, el experimento no pudo ser desarrollado ni finalizado en los términos que se tenían contemplados. A aquellos ratones que pudieron ser sacrificados en los puntos de tiempo designados, se les extrajo el bazo para cuantificación de las células de B-ALL humana y células T. Los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos de tejidos murinos que estaban programados para evaluar la completa depleción de las células CART19-CD20 con rituximab, no pudieron ser realizados.

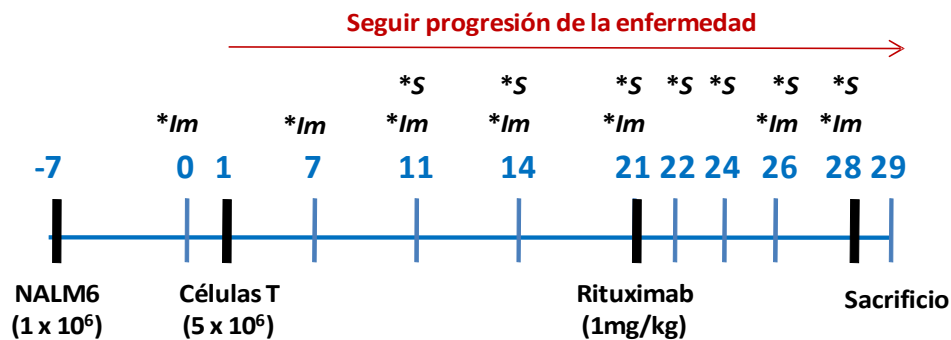


Figura 3.5: Línea de tiempo del diseño experimental. ***Im:** Imagen de bioluminiscencia; ***S:** Muestra de sangre

4.- RESULTADOS

1. Expresión del plásmido pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 en células HEK293T

El paso inicial fue obtener el constructo CAR19-2A-CD20 en el vector lentiviral pCCL y los primeros intentos para su creación se llevaron a cabo a partir de las configuraciones pCCL-CAR19 y pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 desarrolladas previamente en nuestro laboratorio. Para comprobar la integridad del vector pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 antes de utilizarlo para amplificar la secuencia 2A-CD20, se procedió a su expresión en células HEK293T. En la **Figura 4.1** se muestran los análisis por citometría de flujo, donde puede observarse la expresión simultánea del CAR19corto y el CD20 en la superficie de las células HEK293T. En el caso del vector pCCL-CAR19, las pruebas de validación para su uso en el ensayo clínico, en curso en ese momento, permitieron obviar este chequeo (para mayores detalles ver publicación de Castellá M y col., 2019 [74]).

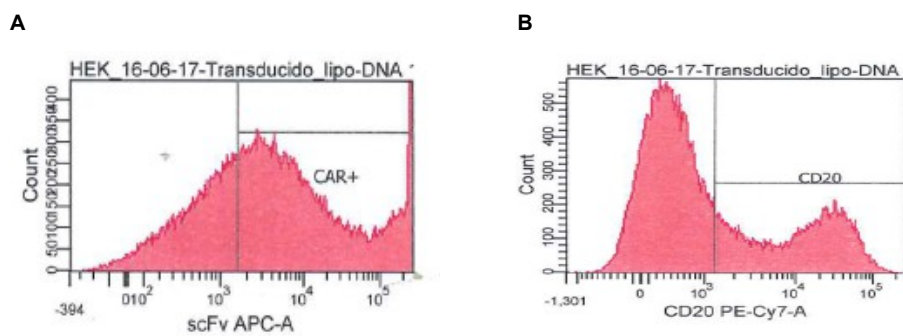


Figura 4.1: Análisis por citometría de flujo de células HEK293T transducidas con el vector pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 y teñidas con los anticuerpos scFv-APC (A) y CD20 PE-Cy7 (B) para detectar el CAR19corto y el CD20, respectivamente.

2. Construcción del plásmido pCCL-CAR19-2A-CD20

Una vez corroborado lo anterior, la tarea siguiente tuvo como finalidad generar el plásmido pCCL-CAR19-2A-CD20. La primera estrategia intentó amplificar por PCR convencional la secuencia 2A-CD20 (990 pb) a partir del fragmento liberado por digestión del pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20, utilizando *primers* que incorporaban sitios de restricción flanqueando ambos extremos del fragmento resultante, para luego ser insertado en el vector pCCL conteniendo el CAR19 (**Figura 3.3**, Materiales y Métodos). Sin embargo, la similitud en secuencia produjo la formación de dímeros entre los *primers forward* y *reverse*, impidiendo que éstos se unieran al sitio del DNA de interés e imposibilitando con ello la amplificación, pese a probar con diferentes condiciones experimentales.

Por lo anterior, se usó como segunda estrategia la modalidad *Overlap-PCR*, la que buscó amplificar por medio de tres PCRs en secuencia (PCR1, PCR2 y PCR3) el fragmento comprendido desde la segunda mitad del CAR19 + 2A + CD20 (1631 pb), para posteriormente ser ligado a continuación de la primera mitad del CAR19 en el vector pCCL-CAR19 previamente digerido (**Figura 3.4**, Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

2.1. PCR 1

Se realizó la PCR1 para amplificar la secuencia que incluye la primera mitad del CAR19 + inicio de 2A + sitio de restricción para MreI en 5' (**Figura 3.4**, Materiales y Métodos), utilizándose como DNA templado el fragmento liberado por digestión del pCCL-CAR19 (**Figura 3.2B**, Materiales y Métodos), y como cebadores un *primer forward* que incorporaba el sitio de restricción para MreI, y un oligonucleótido designado como Oligo 2 actuando de *primer reverse*. En la **Figura 4.2A** se muestra un gel de agarosa donde se observan los productos de amplificación de tres muestras y su correspondiente control negativo, demostrándose la obtención del fragmento con la longitud esperada (663 pb).

2.2. PCR 2

La PCR2 empleó como molde el segmento liberado por digestión del pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20 (**Figura 2A**, Materiales y Métodos) y como cebadores el Oligo 1 (actúa como *primer forward*) y un *primer reverse* que contiene una secuencia para la enzima de restricción MreI, para amplificar el fragmento que comprende el final del CAR19 + 2A-CD20 + sitio de restricción para BstBI en 3' (**Figura 4**, Materiales y Métodos). En la

Figura 4.2B se puede apreciar la amplificación de fragmentos con la longitud esperada (1050 pb) en cada una de las tres muestras analizadas.

2.3. PCR 3

Finalmente, se realizó la PCR3 para llegar a amplificar la secuencia buscada, consistente en la segunda mitad del CAR19 + 2A-CD20 flanqueada en los extremos 5' y 3' por los sitios de restricción para MreI y BstBI, respectivamente, para lo cual se utilizó como moldes los fragmentos amplificados y purificados de las PCR1 y PCR2, y como cebadores los *primers forward* y *reverse* conteniendo las secuencias para las correspondientes enzimas de restricción (**Figura 3.4**, Materiales y Métodos). Si bien en la **Figura 4.2C** se observa amplificación de una banda cercana a los 1650 pb (que podría corresponder al fragmento esperado de 1631 pb), hay también amplificación de otras secuencias no deseadas. Es por ello que este fragmento se purificó y digirió con las enzimas de restricción MreI y BstBI, con el fin de comprobar que corresponde efectivamente a la secuencia buscada.

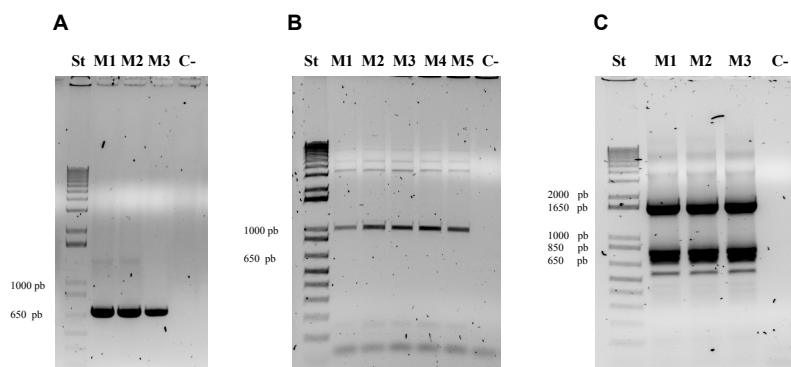


Figura 4.2: Geles de agarosa mostrando los fragmentos amplificados por PCR. Se observan los productos de amplificación del PCR1 (A), del PCR2 (B) y del PCR3 (C).

St= Standard, M= Muestra, C(-)= Control negativo (sin DNA molde)

2.4. Digestión del producto de la PCR 3

Si bien en la PCR3 no fue posible obtener sólo la amplificación del fragmento cercano a 1650 pb, este fragmento se purificó y se digirió con las enzimas de restricción MreI y BstBI, con el fin de comprobar que corresponde efectivamente a la secuencia buscada (segunda mitad del CAR19+2A+CD20 conteniendo sitios de restricción en el extremo 5' para MreI y en el extremo 3' para BstBI) y de ser así, prepararla para su inserción en el vector pCCL-CAR19 previamente digerido con las mismas enzimas. Sin embargo y como puede observarse en la **Figura 4.3**, en vez de obtenerse una única banda, la digestión originó varios fragmentos inesperados, cuyas longitudes no coincide ninguna con la de la secuencia deseada.

Para corroborar que el target no fue amplificado, se clonó la banda purificada del PCR3 en un vector TOPO para luego ser digerido por las mismas enzimas (resultados no mostrados). Los resultados arrojaron nuevamente un patrón de bandas no coincidente con el esperado. Con ello puede afirmarse que el fragmento cercano a 1650 pb amplificado en el PCR 3 no es la secuencia buscada y que ésta junto a las otras bandas amplificadas, obedece a la unión inespecífica de los *primers* a sitios del DNA que no son los de interés.

A raíz de lo anterior, el paso siguiente fue introducir modificaciones en las condiciones experimentales de la PCR3 para intentar lograr el objetivo. Así, para inducir la correcta unión de los cebadores a los sitios diana y evitar con ello la amplificación inespecífica, se recurrió a añadir cantidades adicionales de MgCl₂ en la reacción, a reducir la cantidad de cebadores y a incrementar tanto el número de ciclos como la temperatura de alineamiento en el programa de amplificación del termociclador, de acuerdo a como se describe en Materiales y Métodos. Sin embargo, pese a incorporar estas modificaciones, fue imposible obtener la amplificación específica del *target* para ser insertado en el vector diana y por ello se envió a sintetizar el vector pCCL-CAR19-2A-CD20 a la empresa ProteoGenix para así continuar con los objetivos propuestos.

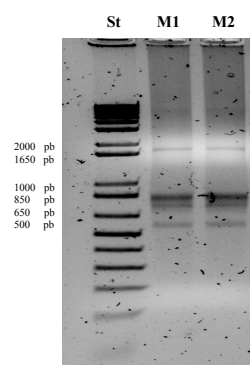


Figura 4.3: Gel de agarosa mostrando la digestión con MreI y BstBI del fragmento cercano a 1650 pb obtenido y purificado a partir de la PCR3

St= Standard, M= Muestra.

3. Expresión del CAR19 y el CD20 en la superficie de los linfocitos T

Obtenido el vector pCCL-CAR19-2A-CD20 desde ProteoGenix, se procedió con la producción de lentivirus y la consiguiente transducción de células HEK293T y linfocitos T, siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos. Luego de comprobar la expresión del CAR19 y del marcador CD20 en células HEK293T (**Figura 4.4**), se logró conseguir una transducción exitosa en linfocitos T y obtener así células CART19-CD20, el primer objetivo de este estudio. En la **Figura 4.5** se muestran los análisis por citometría de flujo donde se confirma la expresión simultánea del CAR19 y el CD20 en la superficie de las células T. El porcentaje de células CART19-CD20 obtenido en esta demostración fue del 15%.

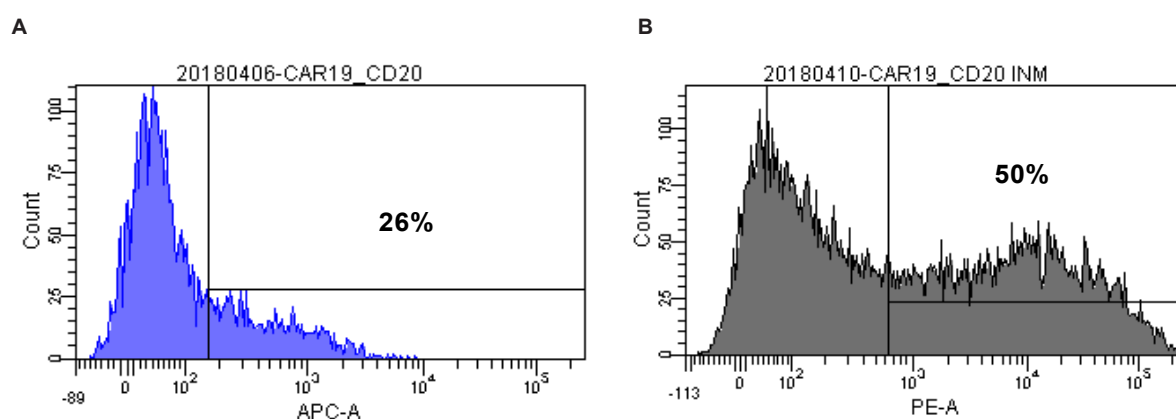


Figura 4.4: Análisis por citometría de flujo de células HEK293T transducidas con el vector lentiviral pCCL-CAR19-2A-CD20 y teñidas con los anticuerpos scFv-APC y CD20-PE para detectar el CAR19 (A) y el CD20 (B), respectivamente.

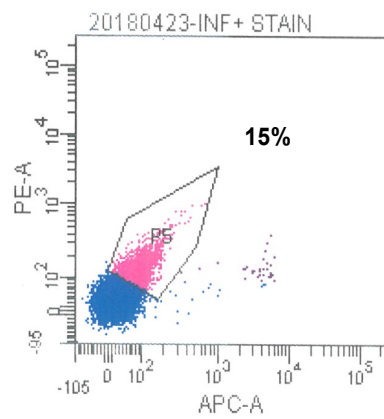


Figura 4.5: Análisis por citometría de flujo de células T transducidas con el vector lentiviral pCCL-CAR19-2A-CD20 y teñidas con los anticuerpos scFv-APC y CD20 PE para detectar el CAR19 y el CD20, respectivamente.

4. Evaluación *in vitro* de la eficacia de las células CART19-CD20

Una vez expandidos los linfocitos CART19-CD20, la tarea siguiente tuvo como finalidad realizar una prueba de citotoxicidad destinada a evaluar *in vitro* su eficacia para erradicar células B leucémicas CD19+ (células NALM6) en co-cultivos de 4 horas (**Figura 4.6A**) y 16 horas (**Figura 4.6B**), y compararla con la de las células CART19 (ARI-0001) desarrolladas por nuestro laboratorio. Previamente a realizar estos ensayos, se estimó el porcentaje de expresión del CAR19 en las células CART19-CD20 y CART19, siendo para las primeras de 43% y para las segundas de 44,6% (datos no mostrados). Los gráficos de la **Figura 4.6** muestran la gran capacidad de los linfocitos CART19-CD20 (células efectoras) para erradicar los linfocitos B leucémicos (células *target*) especialmente después de 16 horas de cocultivo, donde las células NALM6 fueron eliminadas en porcentajes cercanos al 90% ante las proporciones células efectoras (E) : células *target* (T) más altas (2:1 y 4:1); incluso se observa que esta actividad citotóxica también resultó ser potente a ratios E:T más bajos. Además, es posible evidenciar un efecto citotóxico menor en las células no transducidas debido a la alorreactividad.

En conjunto estos resultados indican que nuestras células CART19-CD20 exhiben una específica y potente actividad citotóxica contra células leucémicas CD19+ *in vitro*, la cual aumenta a medida que el ratio E:T se incrementa, aunque ésta se muestra comparativamente menor a la de los linfocitos CART19.

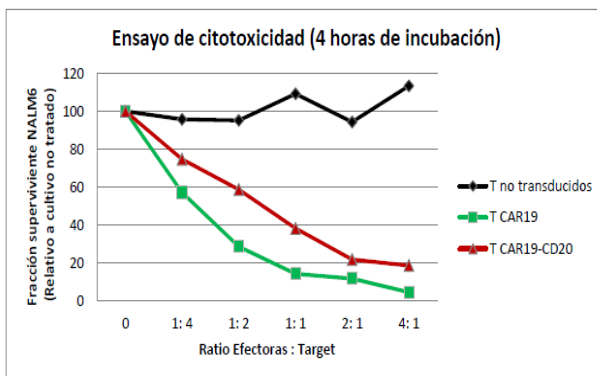
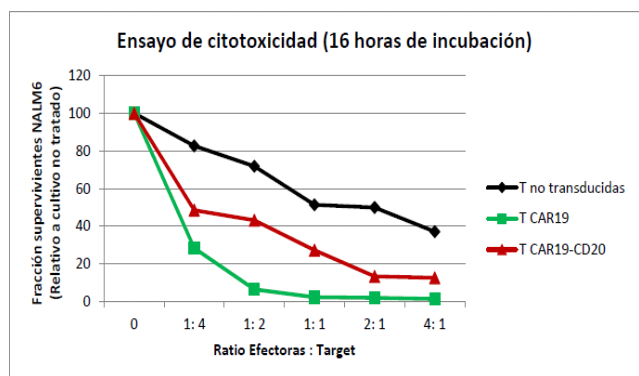
A**B**

Figura 4.6: Gráficos muestran la actividad citotóxica de las células CART19-CD20 (en rojo), CART19 (en verde) y células T no transducidas (en negro) frente a NALM6, medida como la fracción superviviente de NALM6 tras cocultivo de 4 horas (A) y 16 horas (B) a diferentes ratios células efectoras/células target. TCAR19-CD20= Células T transducidas que expresan el CAR19 y el CD20; TCAR19= Células T transducidas que expresan el CAR19; T no transducidas= Células T no transducidas (Control negativo).

5. Análisis de citocinas producidas por las células CART19-CD20

Se midió la producción de citocinas de las células CART-19-CD20 a partir de los sobrenadantes colectados de los co-cultivos de células efectoras : células *target* después de 4 horas y se compararon con las células T no transducidas (**Figura 4.7**). El análisis de citoquinas, efectuado utilizando la técnica Luminex, permitió determinar los niveles de INF- γ e IL-17a a diferentes ratios y mostrar la capacidad de los linfocitos CART19-CD20 para inducir la liberación de citoquinas. En la **Figura 4.7** se muestra el incremento significativo en los niveles de las interleuquinas proinflamatorias INF- γ (**A**) e IL-17a (**B**) a medida que aumentó el porcentaje de linfocitos CART19-CD20 con respecto a las NALM6, a diferencia de lo que sucedió con las células no transducidas donde este efecto no fue observado. Por otro lado y como era de esperar, una disminución en los niveles de la citoquina inhibitoria IL-10 fue evidenciado (**Figura 4.7C**). En lo referente a las otras citocinas analizadas (IL-1 β e IL-6), los resultados fueron no concluyentes (resultados no mostrados).

Estos resultados fueron coherentes con las pruebas anteriores, lo que demuestra no sólo efectividad de los linfocitos CART19-CD20 para destruir a las células leucémicas *target*, sino también una capacidad de inducir la liberación de citoquinas responsables de activar otros mediadores y potenciar así la respuesta inmune frente al objetivo.

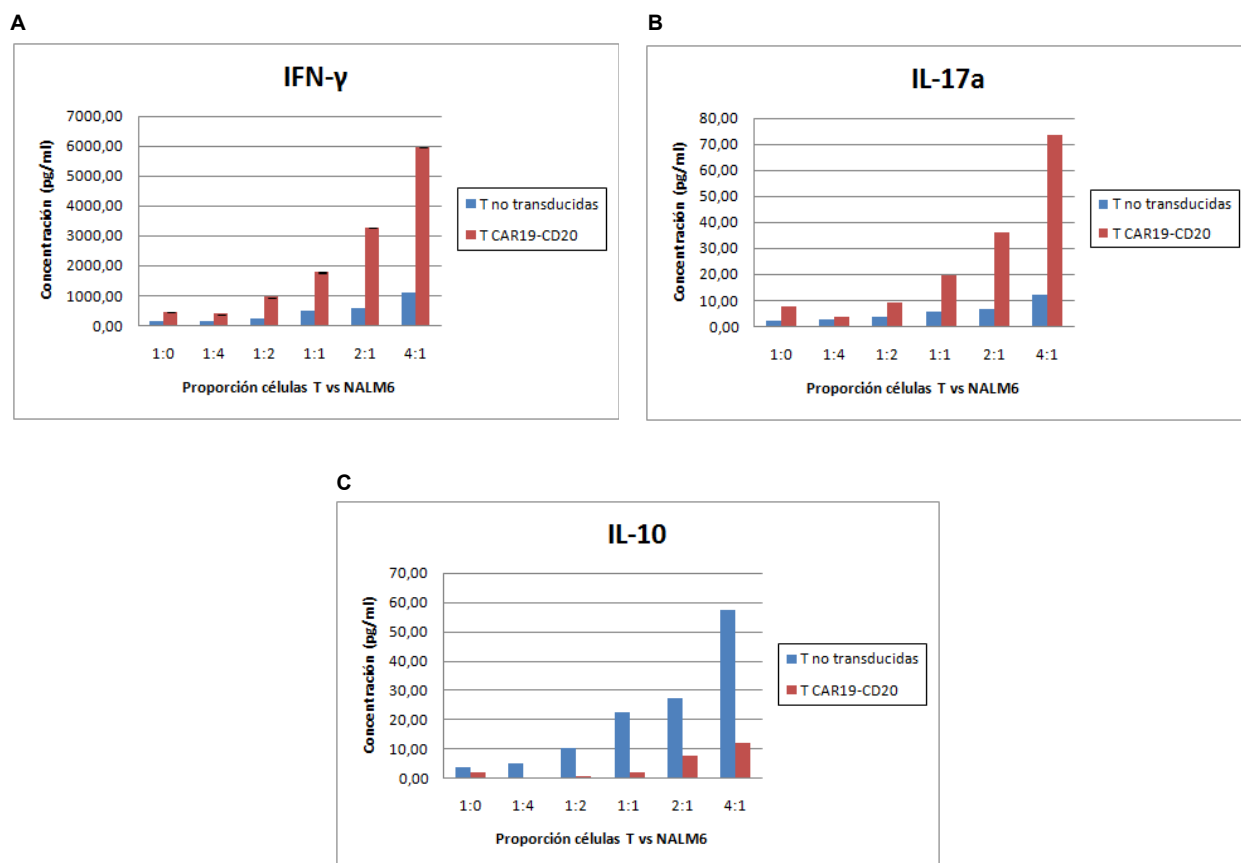


Figura 4.7: Gráficos muestran los niveles de citocinas INF- γ (A), IL-17a (B) e IL-10 (C), medidos a través de Luminex, desde los sobrenadantes del ensayo de citotoxicidad de 4 horas de co-cultivo de las células CART19-CD20/células T no transducidas versus NALM6 a los diferentes ratios. T CAR19-CD20= Células T transducidas que expresan el CAR19 y el CD20; T no transducidas= Células T no transducidas (Control negativo).

6. Depleción *in vitro* de las células CART19-CD20 mediado por el anticuerpo anti-CD20 rituximab

Se evaluó la capacidad de rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) para inducir la eliminación citotóxica *in vitro* de las células CART19-CD20, mediante un ensayo de 4 horas basado en citotoxicidad mediado por complemento (CDC). Para este análisis se estimó que el 93,6% de las células expresaban CD20 (datos no mostrados) y tras ello se incubaron las células CART19-CD20 con concentraciones crecientes de rituximab en presencia de complemento. Luego las estimaciones fueron determinadas mediante análisis por citometría de flujo considerando el porcentaje de linfocitos CD3+ con respecto al total de células (**Figura 4.8A**) y, de manera complementaria, el de linfocitos muertos, el que fue calculado a partir del porcentaje de linfocitos vivos ($100\% - \%$ de linfocitos vivos) (**Figura 4.8B**). Se ha podido demostrar que rituximab tiene capacidad para depletar las células CART19-CD20 mediante CDC en un modo proporcional a la concentración. Así, como puede apreciarse en la **Figura 4.8A**, el porcentaje de células CART19-CD20 alcanzó una disminución de un 37,5% a las concentraciones más altas de rituximab con respecto al control sin el fármaco (0 $\mu\text{g/ml}$), lo que se correlaciona con la mortalidad evidenciada en la **Figura 4.8B**, donde se observa que se incrementa el porcentaje de células CART19-CD20 muertas en un 34,8% a las mayores concentraciones de rituximab en referencia a las mismas células sin tratamiento (0 $\mu\text{g/ml}$).

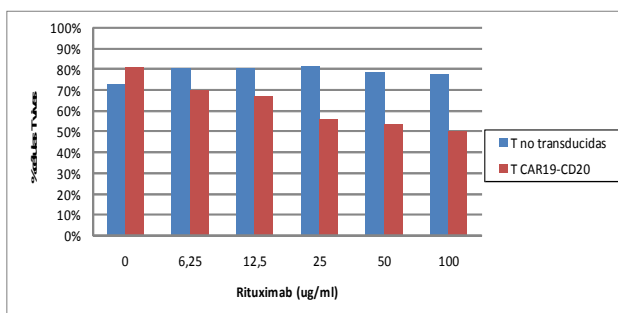
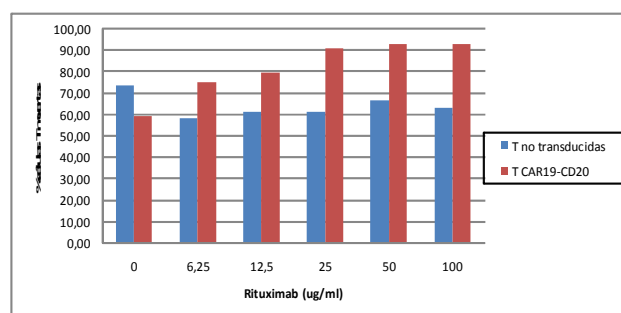
A**B**

Figura 4.8: Ensayo basado en citotoxicidad mediado por complemento (CDC). Gráficos muestran las células CART19-CD20 (en rojo) y células T no transducidas (en azul) referido a porcentajes de células vivas (A) y células muertas (B) frente a concentraciones crecientes de rituximab. T CAR19-CD20= Células T transducidas que expresan el CAR19 y el CD20; T no transducidas= Células T no transducidas (Control negativo).

7. Evaluación *in vivo* de la eficacia de CART19-CD20 y su eliminación con rituximab en un modelo murino de xenoinjerto de B-ALL

El paso siguiente fue intentar estudiar la eficacia *in vivo* de las células CART19-CD20. Para ello se buscó comparar la actividad citotóxica de las células CART19-CD20, compararla con las de las células CART19 y comprobar su susceptibilidad a ser depletadas con el anticuerpo anti-CD20 rituximab, a través de un experimento de xenoinjerto de leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) humano en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rd^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), de acuerdo a como se describe en detalle en Materiales y Métodos.

Lamentablemente, a causa de la prematura muerte de los animales por la rápida progresión de la enfermedad y a la paralización debida a COVID-19, el experimento no pudo ser desarrollado ni finalizado en los términos que se tenían contemplados, ni tampoco pudo ser repetido. A aquellos ratones que pudieron ser sacrificados en los puntos de tiempo designados, se les extrajo el bazo para cuantificación de las células de B-ALL humana y células T. Los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos de tejidos murinos que estaban programados para evaluar la completa depleción de las células CART19-CD20 con rituximab, no pudieron ser realizados.

5.- DISCUSIÓN

Los resultados espectaculares evidenciados por la terapia con células T autólogas modificadas genéticamente para que expresen un CAR anti-CD19 (CART19), la han convertido en una modalidad de inmunoterapia revolucionaria para tratar síndromes linfoproliferativos con células positivas para CD19: leucemia linfoblástica aguda, linfomas no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica en la estirpe B. Esta opción terapéutica ha permitido observar (en pacientes tras varias líneas de tratamiento previas) tasas de respuesta altas, que conllevan una notable ausencia de enfermedad y un aumento en la supervivencia general [74]. Estos resultados provinieron de varios ensayos clínicos multicéntricos internacionales y condujeron a la aprobación por parte de la FDA (Agencia americana de medicamentos y alimentos), EMA (Agencia europea de medicamentos) y de otras autoridades reguladoras, de cuatro inmunoterapias para su uso clínico como tratamiento de segunda línea (tisagenlecleucel, axicabtagene ciloleucel, brexucabtagene autoleucel y lisocabtagen maraleucel) [75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87].

Las grandes expectativas han motivado a que actualmente se estén realizando muchos ensayos clínicos con células CART19 ante la necesidad de aumentar el índice terapéutico, mejorar los resultados en pacientes con enfermedad recurrente o refractaria, disminuir la ocurrencia de toxicidades severas o facilitar su manejo, y reducir sus costos económicos [86]. Considerando este último punto, nuestro grupo de investigación desarrolló una nueva construcción CAR dirigida a CD19 basada en un propio anticuerpo anti-CD19 (A3B1) y en un diseño similar de CAR desarrollado por la Universidad de Pensilvania en colaboración con el Children's Hospital of Philadelphia (Upenn-CHOP). Este enfoque CART19, denominado como ARI-0001, nació con la finalidad de disponer de una terapia para neoplasias hematológicas malignas CD19+ que sea asequible para los pacientes que se atienden en hospitales públicos. Los resultados arrojados por un ensayo clínico piloto (CART19-BE-01, ClinicalTrials.gov: NCT03144583), destinado al tratamiento de neoplasias malignas CD19+ recidivantes/refractarias en pacientes adultos y pediátricos, demostraron que este producto presentó un funcionamiento y efectividad comparables a otras construcciones CART19 utilizadas en la clínica y permitieron que la AEMPS aprobara las células ARI-0001 bajo la Cláusula de Exención Hospitalaria para el tratamiento de pacientes con ALL R/R en mayores de 25 años [74, 90, 91].

Las células CART, como "fármacos vivos" con potencial para una expansión exponencial *in vivo* y una persistencia a largo plazo, tienen la capacidad de poder evocar una potencia antileucémica única al tiempo que pueden provocar toxicidades significativas. De este modo, los posibles efectos en el objetivo y fuera del tumor en los tejidos normales son unos de los principales desafíos que deben enfrentar las inmunoterapias con células CART. La aplasia permanente de células B constituye un efecto adverso que experimentan todos los pacientes que se someten a la inmunoterapia CART19 y es debido a que el CD19 es un marcador de células B ampliamente expresado

en la mayoría de las neoplasias malignas de células B, pero también se expresa en células B normales, por lo que la respuesta exitosa de las células CART involucra que su capacidad de exterminio de células B permanezca indefinidamente agotando también las células B normales. Los efectos de la aplasia de células B debe controlarse mediante la infusión periódica de gammaglobulinas y si bien esta terapia de reemplazo resulta efectiva para enfrentar las complicaciones secundarias a la hipogammaglobulinemia resultante, puede necesitar su administración de por vida (existen ya pacientes con una década de linfopenia B post-CART19 [139]). Esto conlleva a la evidente dependencia del paciente a esta infusión sistemática que, además de altos costos, podría incrementar el riesgo de desabastecimiento del suministro, como es esperable si la terapia CART19 llega a transformarse en un tratamiento más común [52, 64, 140]. Dicho suministro resulta ser un elemento esencial para la supervivencia de muchos pacientes receptores de esta inmunoterapia, así como lo es para aquellos con inmunodeficiencias humorales primarias.

Este trabajo propone un nuevo desarrollo dentro del enfoque CART19 para erradicar las células CART después de que hayan realizado su función de eliminación del cáncer. Para ello desarrollamos células T con el CAR dirigido a CD19 junto con la coexpresión del marcador de superficie CD20 (CART19-CD20) para crear un sistema con una actividad sólida y específica frente a células B CD19+ pero susceptible de ser erradicado con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab. Esta nueva construcción CAR se basó en los diseños definidos previamente en nuestro laboratorio [74, 138] y comprende la secuencia que codifica el scFv del anticuerpo monoclonal anti-CD19 A3B1 más la región bisagra y transmembrana de CD8 y los dominios de señalización 4-1BB y CD3 ζ , seguida de la secuencia para el péptido 2A y finalmente el gen que codifica para la molécula CD20.

La molécula objetivo de nuestra propuesta es el marcador de superficie CD19. El CD19 se ha convertido en el objetivo central de diversas inmunoterapias frente a neoplasias malignas de células B al ser un TAA que desempeña un papel más importante que otros reconocidos marcadores de membrana pues su expresión rara vez se pierde. Además, si bien el CD19 se expresa también en células B normales y precursores de células B, no lo hace en células madres pluripotentes [64, 73]. Como se ha mencionado, simultáneamente al CAR anti-CD19 se expresa el marcador de superficie específico CD20, el cual funciona como una etiqueta celular y un objetivo ideal para los anticuerpos monoclonales anti-CD20 que eliminan *in vivo* las células B, como rituximab. CD20 es un antígeno específico de la diferenciación de la célula B que se expresa en las células B normales en todas las etapas de su maduración (excepto en los plasmablastos y en las células plasmáticas) y en la mayoría de las células B malignas [64, 70, 141]. Si bien la función de CD20 no ha sido completamente dilucidada, existe evidencia considerable de que participa en el transporte de calcio a través de la membrana de las células B y que tiene un papel importante en la regulación de la proliferación de estas células [142].

Nosotros incorporamos en nuestra construcción la secuencia para el péptido

autoescindible del teschovirus porcino (P2A) para inducir la expresión concomitante del CAR19 y el CD20 en la superficie de las células T. Son varias las estrategias que se han empleado para la expresión simultánea de más de un gen en células utilizando un solo plásmido, las que incluyen múltiples promotores fusionados a los marcos de lectura abiertos (ORF) de los genes, inserción de señales de empalme entre genes, fusión de genes cuyas expresiones están impulsadas por un solo promotor, inserción de sitios de escisión proteolíticos entre genes, la inserción de sitios de entrada ribosomales internos (IRES) entre genes y los péptidos 2A "autoescindibles". De estas estrategias, IRES se ha utilizado ampliamente debido a que presenta una serie de ventajas (permitir la co-expresión asegurada de genes antes y después de IRES, factibilidad de agregar secuencias de localización subcelular al gen después de IRES y disponibilidad de plásmidos de expresión comerciales que albergan IRES), sin embargo, tiene limitaciones importantes. Una de estas desventajas es su gran tamaño (suele ser superior a 500 nucleótidos), lo que podría ser un problema cuando el plásmido en el que se han de incluir estas secuencias debe empaquetarse en vectores virales con una capacidad muy limitada o cuando se utilizan varios IRES para generar plásmidos multicistronicos; así como también la diferencia en los niveles de expresión entre genes antes y después de IRES (la eficiencia de traducción de un gen ubicado después de IRES es mucho menor que la de un gen ubicado antes de él). Para superar estas limitaciones, los péptidos 2A "autoescindibles" han despertado gran interés por su alta eficiencia de escisión y su tamaño pequeño, que les permite escindir fácilmente múltiples proteínas minimizando los riesgos de pérdida de función de los genes co-expresados, al tiempo que posibilitan que las proteínas unidas por 2A puedan expresarse en todos los tipos de células eucariotes a niveles relativamente altos. Los péptidos 2A son oligopéptidos virales de 18 a 22 aminoácidos de longitud que median en la "escisión" de polipéptidos durante la traducción en células eucariotas. Generalmente reciben el nombre del virus del que derivan y los péptidos 2A que se han utilizado más ampliamente en la investigación biomédica son el F2A (virus de la fiebre aftosa), E2A (virus de la rinitis equina A), P2A (teschovirus-1 porcino) y T2A (virus thosa asigna) [143]. Una serie de estudios [143, 144, 145] han comparado funcionalmente la actividad de las secuencias 2A más utilizadas y los resultados han demostrado que la secuencia P2A presenta una mayor eficiencia de escisión. Teniendo en cuenta los resultados de estas investigaciones, nosotros decidimos coger esta opción y no las demás para incluirla en nuestra construcción. Además, existen estudios que sugieren varios ajustes a la secuencia, como es la incorporación de una secuencia enlazadora Gly-Ser-Gly *upstream* de la secuencia P2A y la adición de una secuencia de escisión de furina alternativa (Arg-Arg-Arg-Arg), que también fueron incorporadas a nuestra propuesta. La inclusión de un sitio de escisión de furina entre la secuencia CAR19 y la P2A permite eliminar esta última secuencia durante el procesamiento de la proteína por parte de la célula y de este modo no permanece en el C-terminal de la molécula CAR19, pudiéndose evitar así posibles efectos en el funcionamiento del CAR19 y otras implicancias que podrían suceder en contextos *in vivo* relacionadas con sistema inmunitario del propio paciente [146].

Dado que nuestra construcción está basada en el enfoque CART19 ARI-0001, se

utiliza igualmente el vector lentiviral de tercera generación pCCL. Si bien este sistema lentiviral de tercera generación es menos eficiente en términos de cantidad de partículas virales por mililitro obtenido y más costoso que los vectores retrovirales o los lentivirus de segunda generación, resulta ser más seguro para su uso en pacientes y es por ello que se les consideró la mejor opción en nuestras propuestas [71]. Se intentaron dos estrategias para la creación del constructo pCCL-CAR19-2A-CD20, las que se llevaron a cabo mediante PCRs consecutivas, sin embargo, los resultados fueron parcialmente infructuosos. La primera de ellas buscó mediante PCR convencional amplificar la secuencia 2A-CD20, a partir de la configuración pCDNA3.1-CAR19corto-2A-CD20, para ser insertada en el vector pCCL-CAR19 detrás del CAR19 con enzimas de restricción. La similitud en secuencia entre los *primers* produjo la formación de dímeros entre ellos, impidiendo su unión al *target* e imposibilitando la amplificación. Esta complementariedad entre cebadores se explica parcialmente porque los *primers forward* y *reverse* compartían una misma secuencia de restricción, pero sobre todo también por el hecho que los cebadores en los inicios de las secuencias a unir en el método de PCR consecutivas, muestran con alto contenido CG presente en la secuencia de ambos. Se buscaron distintas temperaturas y condiciones para evitar esta competencia. Ante lo anterior y considerando que el fragmento a amplificar era complejo, la segunda estrategia se intentó a través de la modalidad *overlap*-PCR buscando la amplificación del fragmento que comprende desde la mitad del CAR19 hasta el final de CD20, para ser insertada en el vector pCCL-CAR19 considerando los puntos de corte para las enzimas de restricción utilizadas. Sin embargo, esta estrategia finalmente tampoco logró la amplificación de la diana, ahora debido a que los *primers* se unieron de forma inespecífica a otros sitios del DNA plasmídico, causando la amplificación de una secuencia no deseada. Si bien para ambas estrategias se usaron DNAs polimerasas de alta fidelidad y alta procesividad para mejorar la calidad de la amplificación, esta consideración por sí sola no fue suficiente para lograr el objetivo y se procedió a aplicar cambios en las condiciones experimentales, especialmente tras no obtener resultados con la modalidad *overlapping*-PCR. Se intentó optimizar el protocolo introduciendo modificaciones significativas que incluyeron la adición de cantidades adicionales de MgCl₂ y la disminución en la concentración de cebadores en la reacción, así como también se aplicaron cambios en el programa de amplificación del termociclador, aumentando el número de ciclos e incrementando la temperatura de alineamiento. Sin embargo, pese a estas intervenciones en el protocolo, no fue posible concretar con éxito la construcción del pCCL-CAR19-2A-CD20. Teniendo en cuenta las dificultades inherentes a la magnitud y características de nuestra secuencia objetivo, que favorecen las uniones inespecíficas de los *primers* con sitios erróneos del DNA molde, las que en definitiva imposibilitaron su amplificación, se decidió sintetizar el vector a la empresa ProteoGenix® para continuar así con la producción de virus y su posterior transfección en las células T.

Para la terapia celular con CART, la que se encuentra basada en la terapia celular adoptiva, los linfocitos T son modificados genéticamente *ex vivo* para expresar el CAR y luego transferirlos al individuo con cáncer. Dado el impacto que puede llegar a tener en

el rendimiento final de las células CART, resulta fundamental seleccionar adecuadamente del tipo específico de célula T que debe usarse para ser transducida con la molécula CAR. Existen autores que han insistido en la importancia de elegir el subconjunto de células T más adecuado para una inmunoterapia adoptiva eficaz, basándose en estudios que han evidenciado la implicancia de las funciones específicas de ciertos subconjuntos de células T, como las células T *naïve*, las células T *stem* de memoria (T_{SCM}) y los clones CD8+ aislados de las células T de memoria central (T_{CM}), que han mostrado un potencial proliferativo superior y una mayor persistencia a largo plazo. Si bien existen investigadores que apuntan en esta línea, la mayoría opta con mayor frecuencia a utilizar células T a granel extraídas a partir de sangre periférica del paciente, siendo también nuestra opción para este trabajo, dado que han resultado ser el más efectivas [4]. En numerosos ensayos de inmunoterapia contra el cáncer se ha comprobado que las combinaciones de subpoblaciones CD8+ con subpoblaciones CD4+ mejoran significativamente la transferencia adoptiva de células T, pudiéndose ver que las células T CD4+ apoyan el desarrollo de las funciones de memoria de las células T CD8+, lo que es primordial en muchos casos para prevenir las recaídas. Por otro lado, la combinación de roles de las diferentes subpoblaciones sin duda potencia la respuesta antitumoral, de modo que mientras las diversas células T CD4+ actúan principalmente de acuerdo al patrón de citocinas efectoras que producen, permitiéndoles desencadenar una respuesta inmune diferente y adaptada a cada situación, las células T CD8+ centran fundamentalmente su función a través de su capacidad citolítica directa y secundariamente mediante la secreción de citocinas. Adicionalmente, hay estudios que han evidenciado que citocinas como las liberadas por las células Th1 y Th2 son capaces de impulsar diferentes tipos de citotoxicidad generadas por las células CART de segunda generación que contienen CD28 [31].

Luego de haber obtenido una producción lentiviral exitosa a través de un sistema que demostró ser efectivo y robusto, llevamos a cabo la modificación genética *in vitro* de los linfocitos para que expresen el CAR, proceso realizado mediante la transfección con los vectores pCCL-CAR19-2A-CD20 y pCCL-CAR19, lo que permitió obtener las células CART19-CD20 y CART19, respectivamente. Se ha confirmado la expresión simultánea y eficiente del CAR19 y el CD20 en la superficie celular, y se ha demostrado que el método de producción de células CART19-CD20 es consistente. Si bien hay expresión de ambas moléculas, se observan diferencias entre los porcentajes de expresión del CAR19 y el CD20, evidenciándose un nivel de expresión superior de este último, detectable tanto en células HEK293T como en linfocitos. La estrategia del péptido 2A precisamente se utilizó para obtener una coexpresión equimolar de las dos proteínas, aunque los resultados obtenidos indican que en situación real no se manifestaron de esta manera. Existe la posibilidad de que la expresión de ambas moléculas ocurra efectivamente a niveles iguales y que la proporción del CAR19 visualizada esté subestimada, siendo en realidad equiparable a la del CD20. Esto se podría tratar de un problema en la detección del CAR19, específicamente del scFv, el cual puede verse alterado por la presencia del CD20, que es una molécula conformacionalmente completa. También hay que considerar que esto puede ser debido

a que se utilizó un anticuerpo que no es específico para el scFv del anticuerpo monoclonal A3B1 (se emplea un anticuerpo policlonal IgG de cabra que reconoce el fragmento F(ab')₂ de la IgG de ratón), situación que no se presentó para la proteína CD20, para la que se usó un anticuerpo monoclonal IgG de ratón específico para CD20 humano.

Las proteínas CD19 conjugadas fluorescentes son buenas herramientas para la detección de la expresión del CAR anti-CD19 en las células CART en muestras clínicas y de investigación mediante citometría de flujo. Si bien lo ideal sería desarrollar un método de detección para cada construcción, ésta generalmente se ha realizado utilizando anticuerpos policlones anti-IgG (a menudo de origen caprino) dirigidos a la estructura extracelular de la molécula CAR (usando un anticuerpo anti-Fc o fragmento F(ab')₂) o a los dominios de unión al antígeno (uso de anticuerpos anti-idiotipo). Estos últimos se unen específicamente a las regiones variables de un scFv y los nuevos anticuerpos monoclonales anti-idiotipo desarrollados contra el scFv anti-CD19 han mostrado ventajas notables y la capacidad para inhibir las funciones efectoras de las células CART anti-CD19, lo que ha permitido su uso en estudios preclínicos y ensayos clínicos. Pese a lo anterior, los anticuerpos anti-idiotipo son en su mayoría difíciles de obtener y no están disponibles comercialmente. También se han usado con éxito la Proteína L de *Peptostreptococcus magnus* para teñir una variedad de CAR, incluidos los CAR que contienen scFv humano, scFv murino y scFv humanizado; y las proteínas de fusión de los dominios extracelulares de la proteína CD19 humana con un fragmento Fc (a menudo de IgG1 humana), conocido como CD19-Fc, que ha adquirido especial importancia con la terapia con CART19 [147, 148]. Más recientemente, Kite Pharma desarrolló los anticuerpos monoclonales de conejo KIP-1 que reconocen el epítipo lineal del enlazador Whitlow que une las cadenas ligera y pesada del scFv del CAR. KIP-1 ha sido utilizado en estudios patrocinados por Kite Pharma y Gilead, sin embargo, es poco plausible que estos anticuerpos enlazadores se encuentren disponibles para la mayoría de los laboratorios académicos sin el patrocinio de la industria [148]. Si bien existen múltiples alternativas de detección del CAR mediante citometría de flujo, son escasos los análisis realizados para comparar la sensibilidad y especificidad entre los diferentes agentes de tinción disponibles. Pese a que la evidencia muestra que el antígeno-Fc (CD19-Fc) es más específico para la detección de células positivas para CAR19 que los anticuerpos policlones anti-IgG y la Proteína L, estos últimos muestran ventajas como ser relativamente baratos y ser más estables en solución, y continúan siendo enfoques comúnmente utilizados [147, 148]. Aunque son comercializados por diversos proveedores, el anticuerpo policlonal de cabra anti-F(ab')₂ de ratón de Jackson ImmunoResearch Laboratories® es el más utilizado, y fue el que se usó para caracterizar el CAR anti-CD19 en Yescarta [148]. Si bien estos anticuerpos anti-IgG presentan ciertas desventajas, como el hecho de ser reactivos policlones, lo que provoca una variación significativa de un lote a otro, su historial de uso exitoso (incluido su utilización en nuestro enfoque ARI-0001) y otros antecedentes relevantes para nuestro objetivo, fueron las consideraciones tomadas en cuenta para optar por esta alternativa.

Por otro lado se sabe que, aunque residual, en individuos sanos se evidencia expresión natural de CD20 en aproximadamente el 3 – 5% de la población total de células T CD3+ [141, 149] y esto, en cierto modo, pudiera también ser un factor que contribuye a la mayor expresión de CD20 en los linfocitos CART19-CD20. Es poco el conocimiento que existe sobre el funcionamiento de CD20 y a pesar de que aún no están claras sus vías moleculares e interacciones, ni existe una comprensión completa de sus mecanismos de regulación, se ha demostrado que varios factores de transcripción y epigenéticos intervienen en la expresión de CD20 en los linfocitos B [150, 151, 152]. Se ha evidenciado que algunos de estos elementos, como los factores de transcripción PU.1 y Oct, son importantes en la alta expresión constitutiva de CD20 en las células B [150, 151] y dado que tales factores se encuentran también presentes en las células T [153, 154, 155], es posible pensar que igualmente podrían influir o condicionar la expresión basal de CD20 en la pequeña población de células T CD20+.

Además, la introducción de una molécula de CD20 conformacional y funcionalmente completa en la superficie de las células T podría afectar su actividad y regulación. Así, se puede sospechar que la presencia del CD20 también podría alterar las células CART influyendo, en cierto modo, en los niveles de expresión del CAR19. Se ha demostrado que CD20 está asociado con la actividad de tirosina y serina quinasas y que presenta interacciones con múltiples proteínas citoplasmáticas y de la superficie celular, existiendo evidencia de que CD20 proporciona señales accesorias importantes para la activación de la célula B. Se sabe que CD20 interactúa con MHC-II, CD40, CD53, CD81, CD82 y la proteína CBP (*C-terminal src kinase-binding protein*), la cual se asocia con las quinasas Src que contribuyen a la transducción de señales [152, 156]. Se ha visto igualmente que CD20 interactúa con el BCR (*B cell receptor*) afectando la fosforilación de las quinasas y proteínas asociadas a este receptor (LYN, SYK, GAB1 y ERK), lo que sugiere que ambas moléculas podrían compartir los mismos componentes de la vía de señalización y activar mecanismos reguladores de retroalimentación negativa, incluida la modulación negativa del BCR [152]. Adicionalmente, los análisis utilizando anticuerpos anti-CD20 revelaron que la asociación del CD20 con el BCR resulta en la fosforilación de los motivos ITAM (motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina) del BCR y en el inicio de una cascada de señalización conducida por las tirosinas quinasas SYK que provoca el flujo de calcio citosólico. Esta capacidad para asociarse y "secuestrar" el potencial de señalización del BCR, junto a la evidencia que sugiere similitudes estructurales con canales iónicos conocidos, ha llevado a suponer que CD20 tiene un papel como canal de calcio [157]. Si bien se requiere más investigación para identificar y entender mejor estas interacciones y mecanismos, con estos datos se puede pensar que la transducción de señales mediado por el CD20 expresado en las células CART podría acoplarse a los eventos de señalización impulsados por el CAR, de modo que CD20 en su rol como canal podría provocar una disminución de la señal y reducir la expresión del CAR19 por fosforilación e internalización del dominio ITAM de CD3ζ. Esto conduce a la necesidad de evaluar exhaustivamente la secuencia de CD20 y comprender mejor los mecanismos biológicos asociados a esta molécula, con el fin de poder mejorar la actividad de nuestro enfoque. Otro de los aspectos a considerar es la

posibilidad de crear una molécula CD20 modificada, esto es, una versión más corta que carezca de cualquier función biológica y que mantenga únicamente su epítipo extracelular para rituximab, para lo cual resulta clave llevar a cabo estudios que permitan una caracterización completa de la interacción de la región scFv de rituximab con su epítipo en CD20.

Una vez activadas y expandidas las células CART, el siguiente paso tuvo como finalidad evaluar *in vitro* su eficacia frente a líneas celulares que presentan el antígeno CD19. A través de ensayos de citotoxicidad *in vitro* y del análisis de citocinas secretadas en los sobrenadantes colectados de dicho ensayo, se pudo demostrar que las células CART19-CD20 exhiben especificidad y una sólida actividad citotóxica y de liberación de citocinas proinflamatorias *in vitro* contra células leucémicas B CD19+. Esto pone en evidencia que la efectividad de destrucción de las células CART19-CD20 mediada por el receptor CAR19 va acompañada además de la liberación de citocinas proinflamatorias, como es lo deseable considerando que amplía la capacidad de estas células para conducir acciones sobre otros mediadores del sistema inmune, logrando así respuestas potentes y completas sobre el objetivo. Si bien las células CART19-CD20 mostraron una potente actividad citotóxica frente a células leucémicas CD19+, ésta fue comparativamente inferior a la de los linfocitos de referencia CART19, lo que podría indicar que la co-expresión del CD20 modificaría en algún grado la intensidad de la señalización del CAR19. Esto conduce a la necesidad de evaluar la secuencia de CD20 y comprender los mecanismos asociados a la coexpresión de este marcador que puedan estar afectando la eficacia anti-CD19 de nuestras células CART, de modo tal de poder introducir las modificaciones necesarias destinadas a mejorar la actividad de nuestro enfoque.

Dado que las terapias CART presentan una extraordinaria persistencia a largo plazo, las potenciales toxicidades y eventos adversos posteriores, algunos de los cuales pueden prolongarse durante toda la vida de las células T genéticamente modificadas, han conducido a que la prevención o el manejo de la toxicidad no deseada constituya uno de los focos claves a ser atendidos para la aplicación exitosa de esta novedosa tecnología. Incluso, se ha visto que la erradicación de las células CART puede ser necesaria para un HSCT exitoso, dado que la persistencia de células T en general (y más en algunos CART) puede mediar el rechazo de las células madre hematopoyéticas infundidas.

Son varias las estrategias de seguridad que se han desarrollado para manejar los efectos de la terapia con células CART, destacando entre ellas las basadas en interruptores genéticos. Los interruptores genéticos son elementos codificados genéticamente integrados en las células CART capaces de activar la muerte de estas células con la administración de un agente farmacéutico inductor. La eliminación de las células CART a través de estos interruptores genéticos permiten “el suicidio/eliminación dirigidos” y se ha impuesto como una estrategia atractiva para la selección, seguimiento y eliminación de estas células en caso necesario. Hasta la fecha, son dos los genes suicidas que se han integrado en las células CART y que han sido probados con éxito en la clínica: el gen que codifica la caspasa 9 inducible (iCasp9) y el gen que codifica la

timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) [131]. Las estrategias que incluyen al gen iCasp9, el cual es activado por un inductor químico de dimerización de molécula pequeña (AP1903/AP20187) que induce la apoptosis de las células CART, destacan por sus resultados robustos en eficacia y seguridad, especialmente en aquellas propuestas que lo combinan a CARs anti-CD19 o anti-CD20 [131, 132, 133, 134]. Los enfoques que incorporan el gen HSV-TK también han demostrado ser sistemas altamente eficaces y seguros; este gen hace que las células CART sean susceptibles a ganciclovir, un antiviral capaz de inducir la inhibición de la síntesis de DNA provocando la muerte celular. Si bien otros profármacos como aciclovir y brivudina también han sido evaluados, se ha comprobado que ganciclovir es el más eficaz para este sistema. HSV-TK es el gen suicida que se ha probado más extensamente en humanos, utilizándose convencionalmente para inducir la muerte de las células T tras la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped grave asociada con la infusión terapéutica de linfocitos del donante después del trasplante de médula ósea alogénico [95, 131, 132].

Otras estrategias de interruptores de eliminación se basan en la coexpresión de la molécula de CAR junto con una proteína de superficie celular truncada, siendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncado (huEGFRt) y el CD20 las dos proteínas truncadas que se han probado como objetivos para la eliminación de las células CART. La molécula suicida huEGFRt se puede activar con el anticuerpo monoclonal terapéutico anti-EGFR cetuximab, mientras que CD20 lo hace con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab, conduciendo a la eliminación selectiva de las células transducidas a través de la CDC y la ADCC [131, 132]. El CD20 humano como objetivo de eliminación para la terapia con células CART ha demostrado ser eficaz en muchos estudios, confirmándose la capacidad de rituximab para producir la depleción de los linfocitos que expresan CD20. Un paso importante lo constituyó la creación de RQR8, una construcción de 136 aminoácidos con epítopes de CD34 y CD20 expresada en la superficie de la célula CART, donde el diseño de epítipo dual le otorga una doble función: como marcador de selección (cuando el CD34 es objetivo de un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (QBEnd/10)) y como molécula suicida (cuando el CD20 es objetivo de rituximab), lo que conduce a CDC y ADCC altamente efectivos y, en consecuencia, convierte a las células T transducidas en muy susceptibles a la lisis por rituximab [95]. Otros enfoques similares desarrollados posteriormente, como el CART123-CD20 para leucemia mieloide humana, han mostrado también una notable efectividad en el agotamiento de las células CART sin perjudicar la remisión de la neoplasia [137]. Aparte de los sistemas mencionados, existen otras estrategias emergentes para controlar las células CART, entre las que destacan los CARs con interruptores de encendido y apagado (*ON-switch* y *OFF-switch* CARs), que utilizan pequeñas moléculas exógenas, se encuentran actualmente en ardua investigación [132]. Los CARs con interruptores de encendido y apagado controlados con lenalidomida [63], junto a los recientemente desarrollados SMASh-CARs (CARs de apagado asistido por moléculas pequeñas basados en proteasas), como el controlado por el fármaco Asunaprevir [135], y los inhibidores de tirosina quinasa, como el dasatinib [136], han mostrado gran potencial por su capacidad para activar y desactivar las células CART de

un modo seguro, rápido, reversible y clínicamente adecuado mediante la administración de un fármaco. Lo anterior reviste de gran relevancia, puesto que a futuro podrían permitir a los pacientes pausar temporalmente su tratamiento con células CART ante la ocurrencia de algún efecto adverso grave u otra condición que lo amerite.

En la actualidad, muchos de los enfoques para eliminar las células T transducidas están siendo evaluados en ensayos pre-clínicos y clínicos. Particularmente, los mecanismos de eliminación que utilizan como anticuerpo farmacéutico el rituximab demuestran una considerable utilidad práctica en la terapia con células CART y una serie de ventajas. Su primera gran ventaja es que disponen de un producto de grado clínico listo para usar y que ha sido ampliamente utilizado de manera exitosa. Además, la monoterapia con rituximab es bien tolerada por la mayoría de los pacientes y no tiene una dosis máxima tolerada, al contrario de lo que puede ocurrir con cetuximab, donde su administración puede acompañarse de exantema cutáneo [95]. Por otro lado, rituximab posee la propiedad de ser un agente linfodepletor muy potente y de acción rápida (86–97% de células eliminadas en 24–72 horas), a diferencia de otros enfoques, como los que incorporan a cetuximab (huEGFRt-cetuximab) cuya respuesta es más lenta (hasta varios días) [95, 132].

El rituximab es un fármaco usado de manera común y segura para erradicar células B en pacientes con ciertas neoplasias hematológicas malignas (linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica y leucemia linfoblástica aguda del adulto), enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico), vasculitis (granulomatosis con poliangéitis y poliangéitis microscópica) y utilizado también con éxito en algunas patologías y condiciones renales (glomerulopatías primarias, trasplante renal y en pacientes con rechazo mediado por anticuerpos) [64, 141]. Rituximab se ha utilizado desde 1997, administrado por vía intravenosa, fue el primer anticuerpo monoclonal terapéutico que se utilizó en el campo de la oncología, estableciendo una nueva clase de fármacos contra el cáncer. A partir de entonces este fármaco ha revolucionado el tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas de células B y actualmente se incorpora de forma rutinaria en los regímenes terapéuticos, demostrando una eficacia clínica que se ha traducido en mejoras importantes en las tasas de respuesta y en una prolongación significativa de la supervivencia general, reduciendo la mortalidad y mejorando el pronóstico clínico de muchos pacientes [158, 159].

Los anticuerpos monoclonales humanizados como rituximab se unen con alta afinidad y especificidad al antígeno CD20 de las células B normales y malignas produciendo su agotamiento a través de varios mecanismos diferentes, que incluyen la CDC, ADCC, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y la apoptosis u otras vías de muerte celular desencadenadas directamente por la unión del rituximab a CD20 [67, 70]. Con respecto a esto último, se ha informado que rituximab puede orquestar su efecto directo a través del bloqueo de varias vías de señalización de supervivencia, como PI3K/AKT, NF- κ B, P38 MAPK y ERK1/2; mediante la sensibilización de las células tumorales a fármacos citotóxicos, por activación de la ruta de apoptosis mediada por

mitocondrias a través de la *downregulation* de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, activación de la vía de señalización Fas a través de la *upregulation* del receptor Fas en la superficie y por la actuación de Bid como mediador entre la vía extrínseca y mitocondrias para liberar proteínas pro-apoptóticas. Si bien está establecido que las caspasas son las principales impulsoras de la apoptosis mediada por rituximab, a través de las vías intrínseca y extrínseca, se ha reconocido que el fármaco puede inducir la muerte celular en ausencia total de activación de caspasas, aunque el conocimiento de la señales intracelulares involucradas es incompleto. Se sugiere que la entrada de calcio con el consiguiente aumento de su concentración intracelular, conduce a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, las que son necesarias para que rituximab estimule la muerte celular independiente de caspasas [142]. Si bien rituximab actúa agotando los linfocitos B circulantes, es importante destacar que tiene un efecto temporal, puesto que este fármaco no se une ni afecta a las células antes de las etapas de linfocitos pre-B, así como tampoco a las células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas que son CD20 negativo. Se ha visto que los linfocitos B se pueden mantener agotados durante 9 meses, y en algunos casos puede continuar hasta 2 años [142]. Así, estudios como el de Abulayha A y col., 2010 y el de Iwata et al., 2011 demostraron que los linfocitos B permanecen agotados durante al menos 6 meses después del tratamiento con rituximab, seguido por una recuperación lenta a partir de precursores tempranos [158, 159].

El éxito de rituximab ha conducido en los últimos años al desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales anti-CD20 buscando superar la resistencia y mejorar las actividades antitumorales. Estas nuevas generaciones incluyen al obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab y ocrelizumab, así como a los anticuerpos CD20/CD3 y a aquellos conjugados a radioisótopos, como ¹³¹I-tositumomab y ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan. Si bien en la actualidad rituximab puede ser reemplazado por estos nuevos anticuerpos anti-CD20, los estudios no han dejado claro aún si éstos son superiores al rituximab en base a su eficacia y seguridad [70, 71]. La larga historia de uso clínico exitoso de rituximab, sumado a la reciente introducción y aprobación de una formulación para administración por vía subcutánea, sin duda fortalecen la posición de este fármaco, por lo que es altamente probable que se mantenga dentro del arsenal terapéutico esencial para las neoplasias malignas de células B sintomáticas y avanzadas. Sobre la base de estas evidencias, en especial por su vigencia, efectividad y seguridad, consideramos que rituximab es el agente ideal para nuestra propuesta de interruptor genético que aquí presentamos.

En este trabajo, evaluamos la capacidad de rituximab para inducir la eliminación citotóxica *in vitro* de células CART19 co-expresando la proteína de superficie CD20 mediante un ensayo basado en CDC. A través de él se pudo demostrar *in vitro* que las células CART19-CD20 son susceptibles a ser reducidas rápidamente con rituximab por medio de una actividad CDC; así en este estudio corroboramos que CD20 puede actuar como un gen de eliminación, confirmándose una vez más el efecto del fármaco sobre células que expresan CD20 en su superficie. Este ensayo presentó ciertos inconvenientes que se deben considerar como la elevada mortalidad basal obtenida como consecuencia

de una transducción lentiviral usando concentraciones altas del vector (MOI de 20), necesario para lograr los niveles de expresión del CD20 sobre el 90% que permiten una mejor visualización y estimación de la mortalidad de las células CART19-CD20. Por otro lado, se debe tener en cuenta que el tratamiento con rituximab provoca una disminución en el porcentaje de linfocitos T y, aunque residual, se ha postulado que la expresión de CD20 en estas células es la causa principal [141, 159]. Así, dado que casi no hay expresión natural de CD20 en los linfocitos T, el rituximab afectaría a los linfocitos CART19-CD20 y muy escasamente a esta población de linfocitos T CD20+.

Aquí se presenta una estrategia de eliminación citotóxica rápida de las células CART19-CD20 donde, a través de la administración de rituximab, se podría inducir la eliminación de estas células sintéticas una vez que hayan erradicado las células leucémicas, como medida de urgencia ante la ocurrencia de eventos adversos severos o incluso para facilitar un HSCT exitoso. La eliminación confiable y completa de las células CART después de la inducción de la remisión de la leucemia es sin duda un factor crítico para el éxito clínico de las inmunoterapias dirigidas a neoplasias malignas de células B, entre otros aspectos porque permite superar eventos adversos, como es la restauración de la población de linfocitos B normales y con ellos de la producción de anticuerpos, tras la aplasia permanente que resulta de la persistencia de las células CART19.

Las células CART19-CD20 demostraron *in vitro* ser un enfoque terapéutico atractivo para la traducción clínica. Resultó muy lamentable no haber podido concluir el ensayo en el modelo preclínico de xenoinjerto murino de B-ALL que buscaba probar el efecto *in vivo* de nuestras células CART. Reiniciar este estudio es sin duda un paso clave en el camino hacia su aplicación clínica.

Entendiendo que las células CART pueden permanecer durante toda la vida del individuo (un estudio encontró que las células CART19 permanecieron detectables más de diez años después de la infusión en pacientes con remisión sostenida [139]), resulta necesario determinar hasta cuando se podría considerar oportuno eliminar las células CART en niños o en adultos sin que hubiera riesgo de recidiva, de modo tal que permitiera suspender el suministro de inmunoglobulinas IV. Sin duda se requieren de estudios para conocer más sobre el potencial a largo plazo y la estabilidad clonal de las células infundidas, así como para comprender mejor la biología de las respuestas sostenidas a la terapia con células CART; sin embargo, las estrategias de suicidio u otros enfoques de eliminación similares, los CARs con interruptores de encendido y apagado, y los inhibidores de tirosina quinasa, resultan muy atractivos para enfrentar éste y otros desafíos. En el futuro, el desarrollo de enfoques innovadores que combinen estas tecnologías podrían permitir, una vez lograda la remisión, inhibir temporalmente la actividad de las células CART para evaluar si se produce o no recidiva; de haberla, podrá ser posible un rescate de la terapia, mientras que si la remisión se mantiene en el tiempo, la activación del mecanismo suicida sería el recurso que permitiría eliminar definitivamente a las células CART.

Sin duda el manejo de la toxicidad de la terapia con células CAR-T constituye un desafío importante y se requiere más investigación para eliminar las deficiencias de los enfoques actuales o para introducir mejoras en los nuevos métodos. Se espera que el desarrollo de CARs de última generación aumente la seguridad de la inmunoterapia antitumoral con células CAR-T y supere sus debilidades actuales, de manera que esta terapia pueda llegar a convertirse en un tratamiento de primera línea.

6.- CONCLUSIONES

1.- Hemos desarrollado una nueva construcción CAR anti-CD19, el CAR19-2A-CD20, conformado por la cadena simple del fragmento variable (scFv) del anticuerpo monoclonal anti-CD19 A3B1, la región bisagra y transmembrana de CD8 (btCD8), más los dominios de señalización 4-1BB y CD3 ζ , seguido de 2A y CD20, este último la etiqueta celular objetivo para rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20).

2.- Dos estrategias diferentes de PCRs resultaron ser intentos infructuosos para obtener un vector lentiviral de tercera generación pCCL-CAR19-2A-CD20, siendo necesaria la síntesis *de novo* del plásmido.

3.- El sistema de producción de vectores lentivirales pCCL-CAR19-2A-CD20 y pCCL-CAR19 demostró ser efectivo y robusto. Se comprobó que la transducción de las células T con tales vectores permitieron la expresión simultánea y eficiente del CAR19 y el CD20 en la superficie celular y se demostró que el método de producción de células CART19-CD20 y CART19 es consistente.

4.- Las células CART19-CD20 exhiben *in vitro* una específica y potente actividad citotóxica frente a líneas celulares que presentan el antígeno CD19, especialmente después de 16 horas de cocultivo, aumentando a medida que el ratio células efectoras:células *target* se incrementa, y alcanzándose porcentajes de citólisis cercanos al 90% ante las proporciones E:T más altas.

5.- Si bien esta actividad citotóxica resulta evidente, su potencia se muestra comparativamente menor a la de las células de referencia CART19. En coherencia con lo anterior, también se observó una respuesta significativa a través de la liberación de las citoquinas proinflamatorias INF- γ e IL-17a.

6.- El rituximab tiene la capacidad para eliminar *in vitro* rápidamente células CART19-CD20+ mediante citotoxicidad dependiente de complemento en un modo proporcional a la concentración, tras observarse que el porcentaje de células CART19-CD20 disminuyó a las concentraciones más altas de rituximab.

7.- Como conclusión final, los hallazgos obtenidos *in vitro* establecen que el enfoque de una inmunoterapia antitumoral basada en células CART19-CD20+ supone una estrategia específica antileucémica frente a células CD19+ con mitigación potencial de la toxicidad a través de una reducción de las células CART controlable por rituximab.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the immune system: The history and background of immunotherapy. *Seminars in Oncology Nursing*. 2019. 35(5):150923. doi:10.1016/j.soncn.2019.08.002
- 2 Blair GE, Cook GP. Cancer and the immune system: an overview. *Oncogene*. 2008. 27:5868. doi:10.1038/onc.2008.277
- 3 Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012. 23(8):viii6–viii9. doi:10.1093/annonc/mds256
- 4 Inthagard J, Edwards J, Roseweir AK. Immunotherapy: enhancing the efficacy of this promising therapeutic in multiple cancers. *Clin Sci (Lond)*. 2019. 18; 133(2):181-193. doi:10.1042/CS20181003
- 5 Jena B, Dotti G, Cooper L. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010. 116(7):1035–1044. doi:10.1182/blood-2010-01-043737
- 6 Salter AI, Pont MJ, Ridell SR. Chimeric antigen receptor–modified T cells: CD19 and the road beyond. *Blood*. 2018. 131(24):2621-2629. doi:10.1182/blood-2018-01-785840
- 7 Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002. 3(11):991-8. doi:10.1038/ni1102-991
- 8 Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991. 254(5038):1643-7. doi:10.1126/science.1840703.
- 9 Clemente CG, Mihm Jr MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996. 77(7):1303-10. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5.

- 10 Mihm Jr MC, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest.* 1996. 74(1):43-7. URL:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8569196/>
- 11 Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 2012. 22(1):23-33. doi:10.1016/j.semcancer.2011.12.004
- 12 González H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018. 32(19-20):1267-1284. doi:10.1101/gad.314617.118
- 13 Palucka AK & Coussens LM. The basis of oncoimmunology. *Cell.* 2016. 164:1233–1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049
- 14 Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011. 144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- 15 Kannan GS, Aquino-Lopez A, Lee DA. Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist. *Blood Rev.* 2017. 31(2):1-10. doi:10.1016/j.blre.2016.08.007
- 16 Falco M, Pende D, Munari E, Vacca P, Mingari MC, Moretta L. Natural killer cells: From surgace receptors to the cure of high-risk leukaemia (Capellini Lecture). *HLA.* 2019. 93(4):185-194. doi:10.1111/tan.13509
- 17 Yoon SR, Kim T-D, Cloi I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Experimental & Molecular Medicine.* 2015. 47(2). e141-e141. doi:10.1038/emm.2014.114
- 18 Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine.* 2016. 279(6):541–562. doi:10.1111/joim.12470
- 19 Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology.* 2013.

- 20 Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the polarization of tumor-associated macrophages into M1 and M2 phenotypes in human cancer tissue: Technicalities and challenges in routine clinical practice. *Frontiers in Oncology*. 2020. 9. doi:10.3389/fonc.2019.01512
- 21 Giese M, Hind L, Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*. 2019. 16;133(20):2159–2167. doi:10.1182/blood-2018-11-844548.
- 22 Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015. 348:74–80. doi:10.1126/science.aaa4971
- 23 Hansen M, Andersen MH. The role of dendritic cells in cancer. *Seminars in Immunopathology*. 2016. 39(3):307–316. doi:10.1007/s00281-016-0592-y
- 24 Guo FF & Cui JW. The role of tumor-infiltrating B cells in tumor immunity. *Journal of Oncology*. 2019. 1–9. doi:10.1155/2019/2592419
- 25 Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedicalscience*. 2017. 11. doi:10.3332/ecancer.2017.721
- 26 Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015. 15(3):185-189. doi:10.1038/nri3808
- 27 Masopust D, Vezys V, Wherry EJ & Ahmed R. A brief history of CD8 T cells. *Eur J Immunol*. 2007. 37:S103–110. doi:10.1002/eji.200737584
- 28 Kumar BV, Connors T & Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*. 2018. 48(2):202-213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007
- 29 Brummelman J, Pilipow K & Lugli E. The single-cell phenotypic identity of human CD8+ and CD4+ T Cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018. 341:63-124. doi:10.1016/bs.ircmb.2018.05.007

- 30 Kokuina E, Breff-Fonseca MC, Villegas-Valverde CA & Mora-Díaz I. Normal values of T, B and NK lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy cuban adults. *MEDICC Review*. 2019. 21(2-3):16-21. doi:10.37757/MR2019.V21.N2-3.5
- 31 Golubovskaya V & Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers*. 2016. 8(3):36. doi:10.3390/cancers8030036
- 32 Thompson ED, Enriquez HL, Fu, Y-X & Engelhard VH. Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010. 207(8):1791–1804. doi:10.1084/jem.20092454
- 33 Galaine J, Borg C, Godet Y & Adotévi O. Interest of tumor-specific CD4 T helper 1 Cells for therapeutic anticancer vaccine. *Vaccines*. 2015. 3(3):490–502. doi:10.3390/vaccines3030490
- 34 Protti MP & De Monte L. Cross-talk within the tumor microenvironment mediates Th2-type inflammation in pancreatic cancer. *OncoImmunology*. 2012. 1(1):89–91. doi:10.4161/onci.1.1.17939
- 35 Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M, Mahdian-shakib, A, Jadidi-Niaragh F, Azizi G, Baradaran B. 2017. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology*. 2017. 322:15–25. doi:10.1016/j.cellimm.2017.10.015
- 36 Wang T, Zhang Z, Xing H, Wang L, Zhang G, Yu N, Wang J, Guo W, Jiang J. Elevated Th22 cells and related cytokines in patients with epithelial ovarian cancer. *Medicine*. 2017. 96(43), e8359. doi:10.1097/MD.00000000000008359
- 37 Nurieva RI, Liu Z, Gangadharan A, Bieerkehazhi S, Zhao Y-Z, Andrei A & Sahoo A. Function of T follicular helper cells in anti-tumor immunity. *The Journal of Immunology*. 2019. 202 (1 Supplement):138.18. URL:https://www.jimmunol.org/content/202/1_Supplement/138.18
- 38 Campbell DJ. Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis. *The Journal of Immunology*. 2015. 195(6):2507–2513.

- 39 Ward-Hartstonge KA & Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clinical & Translational Immunology*. 2017. 6(9),e154. doi:10.1038/cti.2017.43
- 40 Lefrançois L & Masopust D. The road not taken: memory T cell fate “decisions.” *Nature Immunology*. 2009. 10(4):369–370. doi:10.1038/ni0409-369
- 41 Raverdeau M, Cunningham SP, Harmon C & Lynch L. $\gamma\delta$ T cells in cancer: a small population of lymphocytes with big implications. *Clinical & Translational Immunology*. 2019. 8(10). doi:10.1002/cti2.1080
- 42 Krijgsman D, Hokland M & Kuppen PJK. The role of natural killer T cells in cancer—A phenotypical and functional approach. *Frontiers in Immunology*. 2018. 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00367
- 43 Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA & Ked RM. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*. 2013. 37(4):273–283. doi:10.1152/advan.00066.2013
- 44 Díaz Martín D, Barcenilla Rodríguez H, Borrero Corte MJ & Álvarez-Mon Soto M. Funciones efectoras de los linfocitos T. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2013. 11(28):1742–1751. doi:10.1016/s0304-5412(13)70551-1
- 45 Strohl W & Naso M. Bispecific T-cell redirection versus chimeric antigen receptor (CAR)-T Cells as approaches to kill cancer cells. *Antibodies*. 2019. 8(3):41. doi:10.3390/antib8030041
- 46 Li T, Wu B, Yang T, Zhang L & Jin K. The outstanding antitumor capacity of CD4+ T helper lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2020. 188439. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188439
- 47 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2021.

- 48 Coventry B & Ashdown M. Complete clinical responses to cancer therapy caused by multiple divergent approaches: a repeating theme lost in translation. *Cancer Management and Research*. 2012. 137. doi:10.2147/cmar.s31887
- 49 The global challenge of cancer. *Nat Cancer* 1,1–2. 2020. doi:10.1038/s43018-019-0023-9
- 50 Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. *Annals of Surgery*. 1893. 18, 68. doi:10.1097/00000658-189307000-00009
- 51 Wang R-F & Wang HY. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Research*. 2016. 27(1):11–37. doi:10.1038/cr.2016.155
- 52 Miliotou AN & Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A new era in cancer immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2018. 19(1):5–18. doi:10.2174/13892010196661804180
- 53 Hughes-Parry HE, Cross RS & Jenkins MR. The evolving protein engineering in the design of chimeric antigen receptor T cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. 21(1):204. doi:10.3390/ijms21010204
- 54 D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L & Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death & Disease*. 2018. 9(3). doi:10.1038/s41419-018-0278-6
- 55 Yu S, Li A, Liu Q, Li T, Yuan X, Han X & Wu K. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017. 10(1). doi:10.1186/s13045-017-0444-9
- 56 Zhang C, Liu J, Zhong JF & Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research*. 2017. 5(1). doi:10.1186/s40364-017-0102-y

- 57 Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B & Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological Reviews*. 2013. 257(1):107–126. doi:10.1111/imr.12131
- 58 Guedan S, Calderon H, Posey AD & Maus MV. Engineering and design of chimeric antigen receptors. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*. 2019. doi:10.1016/j.omtm.2018.12.009
- 59 Fujiwara K, Tsunei A, Kusabuka H, Ogaki E, Tachibana M & Okada N. Hinge and transmembrane domains of chimeric antigen receptor regulate receptor expression and signaling threshold. *Cells*. 2020. 9(5): 1182. doi:10.3390/cells9051182
- 60 Bridgeman JS, Ladell K, Sheard VE, Miners K, Hawkins RE, Price DA, Gilham DE. CD3ζ-based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy. *Clin Exp Immunol*. 2014. 175(2):258-67. doi: 10.1111/cei.12216.
- 61 Fu Z, Zhou J, Chen R, Jin Y, Ni T, Qian L & Xiao C. Cluster of differentiation 19 chimeric antigen receptor T-cell therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters*. 2020. 36. doi:10.3892/ol.2020.11897
- 62 Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M & Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *British Journal of Cancer*. 2018. doi:10.1038/s41416-018-0325-1
- 63 Jan M, Scarfó I, Larson RC, Walker A, Schmidts A et al. Reversible ON- and OFF-switch chimeric antigen receptors controlled by lenalidomide. *Sci Transl Med*. 2021. 13(575):eabb6295. doi:10.1126/scitranslmed.abb6295
- 64 Jacoby E, Shahani SA, Shah NN. Updates on CAR T-cell therapy in B-cell malignancies. *Immunological Reviews*. 2019. 290(1):39–59. doi:10.1111/imr.12774
- 65 Vaillant AAJ & Stang CM. Lymphoproliferative disorders. StatPearl (internet). Treasure Island (FL): StatPearls. 2022. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537162/>

- 66 Cuenca M & Peperzak V. Advances and perspectives in the treatment of B-cell malignancies. *Cancers*. 2021. 13(9):2266. doi:10.3390/cancers13092266
- 67 Management of lymphoproliferative disorders. Supplements and Featured Publications, Clinical Update on Oncology Treatments and Trends. 2006. 12(3). URL:<https://www.ajmc.com/view/mar06-2279ps64>
- 68 Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. 2006. 354(17):1813–1826. doi:10.1056/nejmra052638
- 69 Park B, Yoo KH, Kim C. Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. *Blood Research*. 2015. 50(4): 194. doi:10.5045/br.2015.50.4.194
- 70 Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, Wenger M, Maloney DG. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: A review of 20 years of clinical experience. *Adv Ther*. 2017. 34(10):2232-2273. doi: 10.1007/s12325-017-0612-x
- 71 Luo C, Wu G, Huang X et al. Efficacy and safety of new anti-CD20 monoclonal antibodies versus rituximab for induction therapy of CD20+ B-cell non-Hodgkin lymphomas: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021. 11:3255. doi:10.1038/s41598-021-82841-w
- 72 Armengol M, Santos JC, Fernández-Serrano M, Profitós-Pelejà N, Ribeiro ML & Roué G. Immune-checkpoint inhibitors in B-cell lymphoma. *Cancers*. 2021. 13(2):214. doi:10.3390/cancers13020214
- 73 Maher J. Clinical immunotherapy of B-cell malignancy using CD19-targeted CAR T-Cells. *Current Gene Therapy*. 2014. 14(1):35–43. doi:10.2174/1566523213666131223130554
- 74 Castellà M, Boronat B, Martín-Ibáñez R, Rodríguez V, Suñé G, Caballero M, Marzal B, Pérez-Amill L, Martín-Antonio B, Castaño J, Bueno C, Balagué O, González-Navarro EA, Serra-Pages C, Engel P, Vilella R, Benitez-Ribas D, Ortiz-Maldonado V, Cid J, Tabera J, Canals JM, Lozano M, Baumann T, Vilarrodona A, Trias E, Campo E, Menendez P, Urbano-Ispizua A, Yagüe J, Pérez-Galán P, Rives S, Delgado J, Juan M. Development of a Novel Anti-CD19

Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019. 12:134-144. doi:10.1016/j.omtm.2018.11.010

- 75 FDA approves brings first gene therapy to the United States. US. Food and Drug Administration (FDA). 2017. URL:<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>
- 76 Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H 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
- 77 FDA approves tisagenlecleucel for adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma. US. Food and Drug Administration (FDA). 2018. URL:<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-relapsed-or-refractory-follicular-lymphoma>
- 78 Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Walter EK, Borchmann P, McGuirk JP et al. JULIET Investigators. Tisagenlecleucel in adults relapsed or refractory difusse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2019. 380(1):45-56. doi:10.1056/NEJMoa1804980
- 79 Ali S, Kjekken R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, Moltu K et al. The European Medicines Agency review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-Cell lymphoma. *The Oncologist*. 2019. 25(2):e321-e327. doi:10.1634/theoncologist.2019-0233
- 80 Axicabtagene ciloleucel (Yescarta) for B-cell lymphoma. *Med Lett Drugs Ther*. 2018. 16.60(1551):e122-123. URL:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30036350/>
- 81 Papadouli I, Mueller-Berghaus J, Beuneu C, Ali S, Hofner B, Petavy F et al. EMA review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *The Oncologist*. 2020. 25(10):894–902. doi:10.1634/theoncologist.2019-0646

- 82 FDA approves brexucabtagene autoleucel for relapsed or refractory mantle cell lymphoma. U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2020. URL:<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-brexucabtagene-autoleucel-relapsed-or-refractory-mantle-cell-lymphoma>
- 83 First CAR-T cell medicine for mantle cell lymphoma. European Medicines Agency news. 2020. URL:<https://www.ema.europa.eu/en/news/first-car-t-cell-medicine-mantle-cell-lymphoma>
- 84 FDA approves brexucabtagene autoleucel for relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2021. URL:<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-brexucabtagene-autoleucel-relapsed-or-refractory-b-cell-precursor-acute-lymphoblastic>
- 85 FDA approves lisocabtagene maraleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma. U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2021. URL:<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-lisocabtagene-maraleucel-relapsed-or-refractory-large-b-cell-lymphoma>
- 86 Briones-Meijide J. Linfocitos T modificados con receptores quiméricos antígeno-específicos (CAR-T) : La revolución de la terapia celular y personalizada para el cáncer. *Farm Hosp.* 43(6). 2019. doi:10.7399/fh.11312
- 87 Al-Juhaishi T & Ahmed S. Selecting the optimal CAR-T for the treatment of B-cell malignancies. *Current Hematologic Malignancy Reports.* 2021. 16(1):32–39. doi:10.1007/s11899-021-00615-7
- 88 Kwon M, Bailen R, Corral LL, Reguera JL, Iacoboni G, Morales RH, Maldonado-Ortiz V, Oreiro MB, Garcia AM, Cibrian NM, Barba P, Delgado J, Terol MJ, Diez Martin JL. Real world of experience axicabtagene ciloleucel for the treatment of relapsed or refractory large B-cell lymphoma in Spain. *Bone Marrow Transplantation.* 2021. 56:37-39. doi:10.1038/s41409-021-01342-6
- 89 Kwon M, Iacoboni G, Reguera JL, Corral LL, Hernani R, Guerreiro M, Caballero AC, Ortiz-Maldonado V, Sanchez JM, Paviglianiti A, Sancho JM, Bastos-Oreiro, Oarbeascoa G, Martin Rojas RM, Catala E, Delgado J, Mussetti A, Sanz J, Calbacho M, Bailen R, Briones J, Hernandez Boluda JC, Garcia-

- Sancho AM, Diez-Martin JL, Barba P. Axicabtagene ciloleucel compared to tisagenlecleucel for the treatment of relapsed or refractory large B-cell lymphoma in the real world setting in Spain. *Blood*. 2021;138:1742. doi:10.1182/blood-2021-147369
- 90 Castellà M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana-Vidósola A, Boronat A, Marzal B, Millán L, Martín-Antonio B, Cid J, Lozano M, García E, Tabera J, Trias E, Perpiña U, Canals JM, Baumann T, Benítez-Ribas D, Campo E, Yagüe J, Urbano-Ispizua Á, Rives S, Delgado J, Juan M. 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. 20;11:482. doi: 10.3389/fimmu.2020.00482
 - 91 Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, Alonso-Saladrigues A, Benítez-Ribas D, Caballero-Baños M, Baumann T, Cid J, Garcia-Rey E, Llanos C, Torrealadell M, Villamor N, Giné E, Díaz-Beyá M, Guardia L, Montoro M, Català A, Faura A, González EA, Español-Rego M, Klein-González N, Alsina L, Castro P, Jordan I, Fernández S, Ramos F, Suñé G, Perpiñá U, Canals JM, Lozano M, Trias E, Scalise A, Varea S, Saez-Peñataro J, Torres F, Calvo G, Esteve J, Urbano-Ispizua A, Juan M, Delgado J. CART19-BE-01: A multicenter trial of ARI-0001 cell therapy in patients with CD19+ relapsed/refractory malignancies. *Molecular Therapy*. 2021. 29(2):636-644. doi:10.1016/j.ymthe.2020.09.027
 - 92 Ortiz-Maldonado V, Rives S, Español-Rego M, Alonso-Saladrigues A, Montoro M, Magnano L, Giné E, Pascal M, Díaz-Beyá M, Castella M, Català A, Faura A, Rodríguez-Lobato LG, Oliver-Caldes A, Martínez-Roca A, Rovira M, González-Navarro EA, Ortega JR, Cid J, Lozano M, Garcia-Rey E, Fernández S, Castro P, Jordan I, Villamor N, Aymerich M, Torrealadell M, Deyà À, Fernández de Larrea C, Benítez-Ribas D, Trias E, Varea S, Calvo G, Esteve J, Urbano-Ispizua A, Juan M, Delgado J. Factors associated with the clinical outcome of patients with relapsed/refractory CD19+ acute lymphoblastic leukemia treated with ARI-0001 CART19-cell therapy. *J Immunother Cancer*. 2021. 9(12):e003644. doi: 10.1136/jitc-2021-003644
 - 93 Ortiz-Maldonado V, Frigola G, Español-Rego M, Balagué O, Martínez-Cibrián N, Magnano L, Giné E, Pascal M, Correa JG, Martínez-Roca A, Cid J, Lozano M, Villamor N, Benítez-Ribas D, Esteve J, López-Guillermo, Campo E, Urbano-Ispizua Á, Juan M, Delgado J. Results of ARI-0001 CART19 cells in patients with chronic lymphocytic leukemia and Richter's transformation. *Front. Oncol*. 2022. 12:828471. doi: 10.3389/fonc.2022.828471

- 94 Ortiz-Maldonado V, Alonso-Saladrigues A, Español-Rego M, et al. Results of ARI-0001 CART19 cell therapy in patients with relapsed/refractory CD19-positive acute lymphoblastic leukemia with isolated extramedullary disease. *Am J Hematol.* 2022. 97(6):731-739. doi:10.1002/ajh.26519
- 95 Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood.* 2014. 124(8):1277–1287. doi:10.1182/blood-2014-01-545020
- 96 Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2014. 371(16):1507–1517. doi:10.1056/nejmoa1407222
- 97 Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science Translational Medicine.* 2017. 9(374):eaaj2013. doi:10.1126/scitranslmed.aaj2013
- 98 Frigault MJ & Maus MV. State of the art in CAR T cell therapy for CD19+ B cell malignancies. *J Clin Invest.* 2020. 130(4):1586-1594. doi:10.1172/JCI129208
- 99 Ortiz de Landazuri I, Egri N, Muñoz-Sánchez G, Ortiz-Maldonado V, Bolaño V, Guijarro C, Pascal M and Juan M Manufacturing and Management of CAR T-Cell Therapy in “COVID-19’s Time”: Central Versus Point of Care Proposals. 2020. *Front. Immunol.* 11:573179. doi:10.3389/fimmu.2020.573179
- 100 Gazeau N, Barba P, Iacoboni G, Kwon M, Bailen R, Reguera JL, Corral LL, Hernani R, Ortiz-Maldonado V, Perez-Martinez A, Maziarz RT, Williamson S, Nemecek ER, Shadman M, Coman A, Green DJ, Chow VA, Hirayama AV, Maloney DG, Turtle CJ, Gauthier J. Safety and efficacy of two anakinra dose regimens for refractory CRS or Icars after CAR T-cell therapy. *Blood.* 2021.138:2816. doi: 10.1182/blood-2021-147454
- 101 Ortiz-Maldonado V, Alonso-Saladrigues A, Caballero-Baños M, Castellà M, Boronat A, Garcia-Rey E, Baumann T, Díaz-Beyá M, Torrebadell M, Català A, Ramos F, Pont S, Cid J, Lozano M, Llanos, Marzal B, Moreno DF, Castro P, Fernández S, Jordan Y, Esteve J, Canals JM, Trias E, Yagüe J, Rovira M, Urbano-Ispizua A, Juan M, Rives S, Delgado J. S1636 Fractionated dosing of ARI-0001 cells (A3B1:CD8:4–1BB:CD3Z CAR19) and early tocilizumab administration

- may reduce the incidence of severe cytokine release syndrome in patients with CD19+ malignancies. *HemaSphere*. 2019. 3:756. doi:10.1097/01.HS9.0000564792.15111.43
- 102 Siegler EL & Kenderian SS.. Neurotoxicity and cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy: Insights into mechanisms and novel therapies. *Frontiers in Immunology*. 2020. 11. doi:10.3389/fimmu.2020.01973
 - 103 Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D. Anti-BCMA CAR T-Cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2019. 380(18):1726–1737. doi:10.1056/nejmoa1817226
 - 104 Fernandez De Larrea C, González-Calle V, Cabañas V, Oliver-Caldés A, Español-Rego M, Rodríguez-Otero P, Reguera JL, López-Corral L, Inogés S, Martín-Antonio B, Paiva B, Rosiñol L, López-Díaz de Cerio A, Tovar N, López-Parra M, Rodríguez-Lobato L, Varea S, Sánchez-Salinas A, Ortiz-Maldonado V, Pérez Simón JA, Prósper F, Juan M, Moraleda JM, Mateos MV, Pascal M, Urbano-Ispizua A. Results from a pilot study of ARI0002h, an academic BCMA-directed CAR-T cell therapy with fractionated initial infusion and booster dose in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2021. 138:2837. doi:10.1182/blood-2021-147188
 - 105 Fernandez De Larrea C, González-Calle V, Oliver-Caldés A, Cabañas V, Rodríguez-Otero P, Español-Rego M, Reguera JL, López-Corral L, Martín-Antonio B, Paiva B, Inogés S, Rosiñol L, López-Díaz de Cerio A, Tovar N, López-Parra M, Rodríguez-Lobato L, Sánchez-Salinas A, Varea S, Ortiz-Maldonado V, Pérez Simón JA, Prósper F, Juan M, Moraleda JM, Mateos MV, Pascal M, Urbano-Ispizua A. S103: Efficacy and safety of ARI0002H, an academic BCMA-directed CAR-T cell therapy with fractionated initial therapy and booster dose in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *HemaSphere*. 2022. 6:4-5. doi: 10.1097/01.HS9.0000843308.71619.a0
 - 106 Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021. 11:69. doi:10.1038/s41408-021-00459-7
 - 107 Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nature Medicine*. 2017. 24(1): 20–28. doi:10.1038/nm.4441

- 108 Baird J, Frank MJ, Craig J, Patel S, Spiegel JY, Sahaf B et al. Anti-CD22 CAR T-cell therapy mediates durable complete responses in adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma after failure of anti-CD19 CAR T-cell therapy and high response rates in adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2021. 136(1): 28-29. doi:10.1016/S2666-6367(21)00105-6

- 109 Schultz LM, Davis KL, Baggott C, Chaudry C, Cunniffe Marcy A et al. Phase 1 study of CD19/CD22 bispecific chimeric antigen receptor (CAR) therapy in children and young adults with B cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). ASH Annual Meeting Oral Presentation. 2018. doi:[10.1182/blood-2018-99-117445](https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-117445)

- 110 Ruella M, Barret DM, Kenderian SS et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevent antigen-loss relapsed after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*. 2016. 126(10):3814-3826. doi:10.1172/JCI87366

- 111 Tu S, Deng L, Huang R, Zhou X, Yang J, Zhou W et al. A novel chimeric antigen receptor T cells therapy strategy that dual targeting CD19 and CD123 to treat relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2018. 132(1):4015. doi:10.1182/blood-2018-99-118526

- 112 Shah NN, Zhu F, Schneider D, Taylor C, Krueger W, Worden A, Longo WL et al. Results of a phase I study of bispecific anti-CD19, anti-CD20 chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells for relapsed, refractory, non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2019. 37(15):2510. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2510

- 113 Scarfò I, Ormhøj M, Frigault MJ, Castano AP, Lorrey S, Bouffard AA et al. Anti-CD37 chimeric antigen receptor T cells are active against B- and T-cell lymphomas. *Blood*. 2018. 132(14):1495–1506. doi:10.1182/blood-2018-04-842708

- 114 Ormhøj M, Scarfò I, Cabral ML, Bailey SR, Lorrey SL, Bouffard AA et al. Chimeric antigen receptor T cells targeting CD79b show efficacy in lymphoma with or without cotargeting CD19. *Clin Cancer Res*. 2019. 25(23):7046-7057. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1337

- 115 Golubovskaya V, Zhou H, Li F, Valentine M, Sun J, Berahovich R et al. Novel CD37, humanized CD37 and bi-specific humanized CD37-CD19 CAR-T cells specifically target lymphoma. *Cancers*. 2021. 13(5): 981. doi:10.3390/cancers13050981
- 116 Qin H, Cho M, Haso W, Zhang L, Tasian SK, Oo HZ et al. Eradication of B-ALL using chimeric antigen receptor-expressing T cells targeting the TSLPR oncoprotein. *Blood*. 2015. 126(5): 629–639. doi:10.1182/blood-2014-11-612903
- 117 Ruella M, Shestova O, Kenderian S, Barrett D, Grupp S, Scholler J et al. Anti-CD123 chimeric antigen receptor redirected T cells for relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014. 16(4): S8. doi:10.1016/j.jcyt.2014.01.017
- 118 Garfall AL, Maus MV, Hwang W-T, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ et al. Chimeric antigen receptor T cells against CD19 for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2015. 373(11):1040–1047. doi:10.1056/nejmoa1504542
- 119 Ramos CA, Savoldo B, Torrano V, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, Liu E, Carrum G, Kamble RT, Gee AP, Mei Z, Wu MF, Liu H, Grilley B, Rooney CM, Brenner MK, Heslop HE, Dotti G. Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated κ light chains. *J Clin Invest*. 2016. 126(7):2588-96. doi:10.1172/JCI86000
- 120 Guo B , Chen M, Han Q, Hui F, Dai H, Zhang W et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. *J Cell Immunother*. 2016. 2(1):28-35. doi:10.1016/j.jocit.2014.11.001
- 121 Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, Amberger M, Quade-Lyssy P et al. CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Therapy*. 2021. 28(9):560–571. doi:10.1038/s41434-021-00254-w
- 122 Drent E, Groen RWJ, Noort WA, Themeli M, Lammerts van Bueren JJ et al. Pre-clinical evaluation of CD38 chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica*. 2016. 101(5):616–625. doi:10.3324/haematol.2015.13762

- 123 Myers RM, Li Y, Barz Leahy A, Barret DM, Teachey DT et al. Humanized CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells in CAR-naïve and CAR-exposed children and young adults with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2021. 39(27):3044-3055. doi:10.1200/JCO.20.03458

- 124 Benjamin R, Graham C, Yallop D, Joswik A, Ciocarlie O et al. Preliminary data on safety, cellular kinetics and anti-leukemic activity of UCART19, an allogeneic anti-CD19 CAR T-cell product, in a pool of adult and pediatric patients with high-risk CD19+ relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018. 132(1):896. doi:10.1182/blood-2018-99-111356

- 125 Neelapu SS, Munoz J, Locke FL, Miklos DB, Brown R et al. First-in-human data of ALLO-501 and ALLO-647 in relapsed/refractory large B-cell or follicular lymphoma (R/R LBCL/FL): ALPHA study. *J Clin Oncol* (internet). 2020. 38:8002. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.8002

- 126 Pegram HJ, Purdon TJ, van Leeuwen DG, Curran KJ, Giralto SA et al. IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015. 29(2):415–422. doi:10.1038/leu.2014.215

- 127 Curran KJ, Seinsträ BA, Nikhamin Y, Yeh R, Usachenko Y, van Leeuwen DG et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression. *Molecular Therapy*. 2015. 23(4):769–778. doi:10.1038/mt.2015.4

- 128 Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell*. 2015. 28(4):415–428. doi:10.1016/j.ccell.2015.09.004

- 129 Yeko 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. 44:412-8. doi:10.1042/BST20150291

- 130 Ying Z, Huang XF, Xiang X, Liu Y, Kang X, Song Y, Guo X et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med*. 2019. 25:947–953. doi:10.1038/s41591-019-0421-7

- 131 Andrea AE, Chiron A, Bessoles S and Haccin-Bey-Abina S. Engineering next-generation CAR-T cells for better toxicity management. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(22):8620. doi:10.3390/ijms21228620
- 132 Moghanloo E, Mollanoori H, Talebi M, Pashangzadeh S, Faraji F, Hadjilooei F, Mahmoodzadeh H. Remote controlling of CAR-T cells and toxicity management: Molecular switches and next generation CARs. *Transl Oncol.* 2021. 14(6):101070. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101070.
- 133 Del Bufalo F, Quintarelli C, De Angelis B, Caruana I, Sinibaldi M et al. Academic, phase I/II trial on T cells expressing a second generation, CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR) and inducible caspase 9 safety switch for the treatment of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) and B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) in children. *Blood.* 2019. 134(1):1341. doi:10.1182/blood-2019-129821
- 134 Foster MC, Roehrs PA, Hucks GE, Grover NS, Armistead PM, Jamieson K et al. Safety and antitumor effects of CD19-specific autologous chimeric antigen receptor-modified T (CAR-T) cells expressing the inducible caspase 9 safety switch (iC9-CAR19 T cells) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood.* 2020. 136(1):36-37. doi:10.1182/blood-2020-139051
- 135 Juillerat A, Tkach D, Busser BW, Temburni S, Valton J, Duclert A, Poirot L, Depil S, Duchateau P. Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch. *BMC Biotechnol.* 2019. 19:44. doi: 10.1186/s12896-019-0537-3
- 136 Mestermann K, Giavridis T, Weber J, Rydzek J, Frenz S, Nerreter T, Mades A, Sadelain M, Einsele H, Hudecek M. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2019. 11:499. doi: 10.1126/scitranslmed.aau5907
- 137 Tasian SK, Kenderian SS, Shen F, Ruella M, Shestova O, Kozlowski M, Li Y, Schrank-Hacker A, Morrisette JJ, Carroll M, June CH, Grupp SA, Gill S. Optimized depletion of chimeric antigen receptor T cells in murine xenograft models of human acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017. 129(17):2395-2407. doi:10.1182/blood-2016-08-736041

- 138 Daniel Segura Garzón. Development and characterization of a mechanism for in vivo selection and ablation of chimeric antigen receptor-transduced T cells. Treball de Recerca del Màster interuniversitari d'Immunologia Avançada, UB-UAB, curs 2014-2015. Unitat de Immunologia de l'Hospital Clínic Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.
- 139 Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, Porter DL, Chen Ch, Collins MA, Peng G et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature*. 2022. 602:1-7. doi:10.1038/s41586-021-04390-6
- 140 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. 38:100596. doi:10.1016/j.blre.2019.100596
- 141 Sentís A, Diekmann F, Llobell A, de Moner N, Espinosa G, Yagüe J, Campistol JM, Mirapeix E, Juan M. Kinetic analysis of changes in T- and B-lymphocytes after anti-CD20 treatment in renal pathology. *Immunobiology*. 2017. 222(4):620-630. doi: 10.1016/j.imbio.2016.11.011
- 142 Abulayha A, Bredan A, El Enshasy H, Daniels I. Rituximab: modes of action, remaining dispute and future perspective. *Future Oncol*. 2014. 10(15):2481-92. doi: 10.2217/fon.14.146. PMID: 25525856
- 143 Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE*. 2011. 6(4): e18556. doi:10.1371/journal.pone.0018556
- 144 Geier M, Fauland P, Vogl T & Glieder A. Compact multi-enzyme pathways in *P. pastoris*. *Chem Commun (Camb)*. 2015. 51:1643–1646. doi:10.1039/c4cc08502g
- 145 Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao, P & Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Scientific reports*. 2015. 5:16273. doi:10.1038/srep16273
- 146 Luke GA. Translating 2A research into practice. In: Agbo, E. C. , editor. *Innovations in Biotechnology* [Internet]. London: IntechOpen; 2012 [cited 2022 Jun 06]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/28712> doi:

- 147 De Oliveira SN, Wang J, Ryan C, Morrison SL, Kohn DB, Hollis RP. A CD19/Fc fusion protein for detection of anti-CD19 chimeric antigen receptors. *J Transl Med.* 2013. 11:23. doi: 10.1186/1479-5876-11-23
- 148 Hu Y, Huang J. The Chimeric Antigen Receptor Detection Toolkit. *Front Immunol.* 2020. 11:1770. doi: 10.3389/fimmu.2020.01770
- 149 Vlaming M, Bilemjian V, Freile JÁ et al. CD20 positive CD8 T cells are a unique and transcriptionally-distinct subset of T cells with distinct transmigration properties. *Sci Rep.* 2021. 11:20499. doi:10.1038/s41598-021-00007-0
- 150 Thévenin C, Lucas BP, Kozlow EJ, Kehrl JH. Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter. *J Biol Chem.* 1993. 15;268(8):5949-56. doi:10.1016/S0021-9258(18)53411-6
- 151 Himmelmann A, Riva A, Wilson GL, Lucas BP, Thevenin C, Kehrl JH. PU.1/Pip and basic helix loop helix zipper transcription factors interact with binding sites in the CD20 promoter to help confer lineage- and stage-specific expression of CD20 in B lymphocytes. *Blood.* 1997. 15;90(10):3984-95. doi:10.1182/blood.V90.10.3984
- 152 Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica.* 2020. 105(6):1494-1506. doi: 10.3324/haematol.2019.243543
- 153 Rothenberg EV, Hosokawa H, Ungerback J. Mechanisms of action of hematopoietic transcription factor PU.1 in initiation of T-cell development. *Front Immunol.* 2019. 20;10:228. doi: 10.3389/fimmu.2019.00228
- 154 Kang SM, Tsang W, Doll S, Scherle P, Ko HS, Tran AC, Lenardo MJ, Staudt LM. Induction of the POU domain transcription factor Oct-2 during T-cell activation by cognate antigen. *Mol Cell Biol.* 1992. 12(7):3149-54. doi: 10.1128/mcb.12.7.3149-3154.1992

- 155 Shakya A, Goren A, Shalek A, German CN, Snook J, Kuchroo VK, Yosef N, Chan RC, Regev A, Williams MA, Tantin D. Oct1 and OCA-B are selectively required for CD4 memory T cell function. *J Exp Med*. 2015. 16;212(12):2115-31. doi: 10.1084/jem.20150363
- 156 Deans JP, Schieven GL, Shu GL, Valentine MA, Gilliland LA, Aruffo A, Clark EA, Ledbetter JA. Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2. *J Immunol*. 1993. 151(9):4494-504.
- 157 Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, Glennie MJ, Cragg MS. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2008. 283(25):16971-84. doi: 10.1074/jbc.M708459200
- 158 Abulayha AM, Tabal SA, Shawesh EI et al. Depletion of peripheral blood B cells with Rituximab and phenotype characterization of the recovering population in a patient with follicular lymphoma. *Leuk. Res*. 2010. 34(3):307–311. doi:10.1016/j.leukres.2009.06.005
- 159 Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Yamaoka K, Nawata M, Yukawa S, Hanami K, Fukuyo S, Miyagawa I, Kubo S, Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *J Rheumatol*. 2011. 38(4):633-41. doi: 10.3899/jrheum.100729