



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e
Inmunología

TESIS DOCTORAL

**Generación de una plataforma para la
producción de células CAR-T alogénicas:
estudios de eficacia y seguridad**

Noelia Maldonado Pérez

Director de tesis:

Dr. Francisco Martín Molina

Granada, Enero 2023



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Noelia Maldonado Pérez
ISBN: 978-84-1117-783-2
URI:<https://hdl.handle.net/10481/81235>

El doctorando / *The doctoral candidate* **Noelia Maldonado Pérez** y el director de la tesis / *and the thesis supervisor/s*: **Dr. Francisco Martín Molina.**

Garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Granada, 20 de enero de 2023

Director de tesis/*Thesis supervisor*
Francisco Martín Molina

Doctorando/*Doctoral candidate*
Noelia Maldonado Pérez

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

- ✓ **Publicación de un artículo científico aceptado en revistas relevantes en el campo de conocimiento de la tesis doctoral, firmada por el doctorando, incluyendo parte de los resultados de la tesis doctoral:**

Noelia Maldonado-Pérez; María Tristán-Manzano; Pedro Justicia-Lirio; Elena Martínez-Planes; Pilar Muñoz; Kristina Pavlovic; Marina Cortijo-Gutiérrez; Carlos Blanco-Benítez; María Castella; Manel Juan; Wenes; Romero; Francisco J. Molina-Estévez; Concepción Marañón; Concha Herrera; Karim Benabdellah; Francisco Martin. Efficacy and safety of universal (TCRKO) ARI-0001 CAR-T cells for the treatment of B-cell lymphoma. *Front Immunol.* 2022 Oct 6; 13:1011858. doi: 10.3389/fimmu.2022. IF 8,787 (2021, IMMUNOLOGY), Q1.

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada

- ✓ **Estancia doctoral en un centro de investigación extranjero:** Estancia en el departamento de oncología de la Universidad de Lausanne (Suiza) bajo la supervisión del Dr. Pedro Romero. Esta estancia se realizó desde el 5 de enero hasta el 4 de julio de 2021, y fue financiada por el programa EMBO (*European Molecular Biology Organization*) para estancias cortas y la beca EFIS (*European Federation of Immunological Societies*)-IL Short-term Fellowship.
- ✓ **Idioma de la tesis doctoral:** La tesis doctoral ha sido escrita en español y será defendida en español. Adicionalmente, y siguiendo los requerimientos de la Universidad de Granada, parte de la tesis doctoral ha sido escrita en inglés (Resumen y conclusiones) como idioma habitual para la comunicación científica, así como las conclusiones serán defendidas en inglés.

Artículos adicionales durante el periodo de tesis doctoral

- ✓ **Maldonado-Pérez N***, Tristán-Manzano M*, Justicia-Lirio P, Muñoz P, Cortijo-Gutiérrez M, Pavlovic K, Jiménez-Moreno R, Nogueras S, Carmona MD, Sánchez-Hernández S, Aguilar-González A, Castella M, Juan M, Marañón C, Marchal JA, Benabdellah K, Herrera C, Martin F. Physiological lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells. *Mol Ther Oncolytics*. 2022 May 18;25:335-349. doi: 10.1016/j.omto.2022.05.003. Erratum in: *Mol Ther Oncolytics*. 2022 Jul 21;26:245. PMID: 35694446; PMCID: PMC9163403. *Shared first authorship.
- ✓ Wenes M, Jaccard A, Wyss T, **Maldonado-Pérez N**, Teoh ST, Lepez A, Renaud F, Franco F, Waridel P, Yacoub Maroun C, Tschumi B, Dumauthioz N, Zhang L, Donda A, Martín F, Migliorini D, Lunt SY, Ho PC, Romero P. The mitochondrial pyruvate carrier regulates memory T cell differentiation and antitumor function. *Cell Metab*. 2022 May 3;34(5):731-746.e9. doi: 10.1016/j.cmet.2022.03.013. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35452600; PMCID: PMC9116152.
- ✓ Cortijo-Gutiérrez M, Sánchez-Hernández S, Tristán-Manzano M, **Maldonado-Pérez N**, Lopez-Onieva L, Real PJ, Herrera C, Marchal JA, Martin F, Benabdellah K. Improved Functionality of Integration-Deficient Lentiviral Vectors (IDLVs) by the Inclusion of IS2 Protein Docks. *Pharmaceutics*. 2021 Aug 6;13(8):1217. doi: 10.3390/pharmaceutics13081217. PMID: 34452178; PMCID: PMC8401568.
- ✓ Pavlovic K, Tristán-Manzano M, **Maldonado-Pérez N**, Cortijo-Gutiérrez M, Sánchez-Hernández S, Justicia-Lirio P, Carmona MD, Herrera C, Martin F, Benabdellah K. Using Gene Editing Approaches to Fine-Tune the Immune System. *Front Immunol*. 2020 Sep 29;11:570672. doi: 10.3389/fimmu.2020.570672. PMID: 33117361; PMCID: PMC7553077.
- ✓ Tristán-Manzano M, Justicia-Lirio P, **Maldonado-Pérez N**, Cortijo-Gutiérrez M, Benabdellah K, Martin F. Externally-Controlled Systems for Immunotherapy: From Bench to Bedside. *Front Immunol*. 2020

Sep 4;11:2044. doi: 10.3389/fimmu.2020.02044. PMID: 33013864; PMCID: PMC7498544.

- ✓ Sánchez-Hernández S, Aguilar-González A, Guijarro-Albaladejo B, **Maldonado-Pérez N**, Ramos-Hernández I, Cortijo-Gutiérrez M, Sánchez Martín RM, Benabdellah K, Martin F. Development of Cellular Models to Study Efficiency and Safety of Gene Edition by Homologous Directed Recombination Using the CRISPR/Cas9 System. *Cells*. 2020 Jun 18;9(6):1492. doi: 10.3390/cells9061492. PMID: 32570971; PMCID: PMC7349026.
- ✓ Benabdellah K, Sánchez-Hernández S, Aguilar-González A, **Maldonado-Pérez N**, Gutierrez-Guerrero A, Cortijo-Gutierrez M, Ramos-Hernández I, Tristán-Manzano M, Galindo-Moreno P, Herrera C, Martin F. Genome-edited adult stem cells: Next-generation advanced therapy medicinal products. *Stem Cells Transl Med*. 2020 Jun;9(6):674-685. doi: 10.1002/sctm.19-0338. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32141715; PMCID: PMC7214650.
- ✓ Martín F, Tristán-Manzano M, **Maldonado-Pérez N**, Sánchez-Hernández S, Benabdellah K, Cobo M. Stable Genetic Modification of Mesenchymal Stromal Cells Using Lentiviral Vectors. *Methods Mol Biol*. 2019;1937:267-280. doi: 10.1007/978-1-4939-9065-8_17. PMID: 30706403.

Otros logros durante el periodo de tesis doctoral: Patentes

- ✓ Francisco Martín Molina; Araceli Aguilar González; **Noelia Maldonado Pérez**; Juan José Díaz Mochón. CRISPNA, a new tool for genome editing and diagnosis. WO2022144437A1. 07/07/2022. Licenciada por CRISPNA Bio.
- ✓ Francisco Martín; María Tristán Manzano; **Noelia Maldonado Pérez**; Pedro Justicia Lirio. Polynucleotide sequences to express transgenes in T cells mimicking the TCR profile Spain. P202030955. 21/09/2020. Licenciada por LentiStem Biotech S.L.
- ✓ Francisco Martín Molina; María Tristán Manzano; **Noelia Maldonado Pérez**; Karim Benabdellah El Khlanji; Pilar Muñoz Fernández. Polynucleotide for safer and more effective

immunotherapies. WO2020099572. 25/05/2020. Licenciada por LentiStem Biotech S.L.

Becas y financiación

El trabajo de investigación presentado en esta tesis ha sido realizado en el laboratorio de Terapia Génica y Celular del Departamento de Medicina Genómica, en el centro de Investigación Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO).

Para su ejecución ha sido financiado con los proyectos PI15/02015, PI18/00337, PI21/00298 del Ministerio de Economía, Comercio y Competitividad y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, el proyecto RD21/0017/0004 de la Red TerAv y los proyectos 2016000073391-TRA, 2016000073332-TRA, PI-57069, PAIDI-Bio326, CARTPI-0001-201, PECART-0031-2020 del CECEyU y Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía FEDER/Fondo de Cohesión Europeo por Andalucía.

Noelia Maldonado Pérez ha disfrutado de un contrato de Formación de Profesorado Universitario FPU17/02268 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Así como de las becas EMBO-STF (8925) y EFIS-IL-STF (20200926) durante la estancia en el extranjero.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS	16
RESUMEN.....	18
ABSTRACT.....	22
ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	35
1. INMUNOLOGIA Y CÁNCER	35
1.1. Las células T: principales actores en la inmunidad tumoral	37
1.1.1. Células T naïve.....	37
1.1.1.1. Receptor de células T (TCR).....	38
1.1.2. Señales en la activación de las células T naïve.....	39
1.1.3. Citotoxicidad mediada por células T.....	41
1.1.4. Diferenciación de las células T	42
1.1.5. Disfunción y agotamiento de las células T	43
1.2. EL PERFIL METABÓLICO DE LAS CÉLULAS T Y SU IMPLICACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL.....	45
1.2.1. Vías metabólicas de las células T	45
1.2.2. Principales rutas que regulan el metabolismo y la actividad de las células T.....	46
1.2.2.1. PI3K/Akt/mTOR.....	46
1.2.2.2. Wnt/ β -catenina	47
1.2.2.3. NF- κ B.....	47
1.2.2.4. JAK/STAT	48

1.2.3.	Adaptación del metabolismo a la función de las células T	49
1.2.3.1.	Metabolismo de células T <i>naïve</i>	49
1.2.3.2.	Metabolismo de las células T efectoras.....	50
1.2.3.3.	Metabolismo de las células T memoria.....	50
2.	HERRAMIENTAS DE TERAPIA GÉNICA PARA INMUNOTERAPIA	52
2.1.	Adición génica (AG)	53
2.1.1.	Métodos virales.....	53
2.1.2.	Sistemas libres de virus	56
2.1.2.1.	Sistemas basados en transposones.....	56
2.1.2.2.	ARNm y otros sistemas	57
2.2.	Edición genómica (EG).....	57
2.2.1.	Mecanismos de reparación	58
2.2.2.	Sistema CRISPR/Cas9: ventajas y desventajas.....	60
3.	TERAPIA CELULAR ADOPTIVA (TCA).....	62
3.1.	Terapia adoptiva con células T	63
4.	INGENIERÍA DE CÉLULAS T: CÉLULAS T-TCR TRANSGÉNICAS Y CÉLULAS CAR-T.....	64
4.1.	TILs de nueva generación.....	64
4.2.	Células T TCR transgénicas.....	65
4.3.	Células CAR-T	66
4.3.1.	Estructura y biología.....	66
4.3.2.	Producción de células CAR-T	70
5.	TERAPIA CAR-T: CÓMO MEJORAR SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y SEGURIDAD	71
5.1.	Éxitos de la terapia CAR-T: productos CAR-T comerciales.	73
5.2.	Limitaciones de las terapias CAR-T dirigidas a CD19.....	76
5.2.1.	Efectos secundarios adversos.....	77
5.2.1.1.	Síndrome de liberación de citoquinas (CRS).....	77

5.2.1.2.	Neurotoxicidad	78
5.2.1.3.	Toxicidades a largo plazo	79
5.2.2.	Pérdida de eficacia terapéutica y recaídas	79
5.3.	Nuevas estrategias.....	81
5.3.1.	Incremento de la persistencia: inducción de la población memoria.....	81
5.3.1.1.	Agonistas mitocondriales	82
5.3.1.2.	Inhibición de rutas metabólicas	82
5.3.1.3.	Cultivo con cócteles de citoquinas.....	84
5.3.2.	Control de la expresión del CAR	84
6.	CÉLULAS CAR-T UNIVERSALES	86
6.1.	Edición génica de las células CAR-T alogénicas	88
6.2.	Desarrollo clínico de las células CAR-T universales.....	90
6.3.	Desafíos de la terapia CAR-T universal.....	96
6.3.1.	EFICACIA.....	96
6.3.2.	SEGURIDAD	96
	HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	100
	OBJETIVOS	103
	MATERIALES Y MÉTODOS	105
1.	CULTIVO CELULAR	105
1.1.	Líneas celulares humanas	105
1.2.	Células T primarias humanas	105
2.	VECTORES LENTIVIRALES.....	106
	VL-ARI-0001.....	106
3.	PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES Y TITULACIÓN.....	106
3.1.	Transfección.....	106
3.2.	Recogida y concentración	107

3.3.	Titulación de los vectores	107
4.	TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL Y ELECTROPORACIÓN	107
5.	CÁLCULO DEL NÚMERO DE COPIAS DEL VECTOR POR CÉLULA (N.C.V.) POR PCR DIGITAL (dPCR)	109
6.	ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES GENERADAS	109
6.1.	Análisis en la secuencia diana (<i>on-target</i>)	109
6.2.	Análisis fuera de la secuencia diana (<i>off-target</i>)	110
6.3.	Secuenciación masiva	110
6.4.	Análisis de largas deleciones por PCR	110
6.5.	Aislamiento y caracterización de largas deleciones	111
7.	CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)	112
8.	ENSAYOS FUNCIONALES	113
8.1.	Respuesta a antígenos alogénicos	113
8.2.	Proliferación	114
8.3.	Citotoxicidad	114
9.	MODELO ANIMAL Y ANÁLISIS POR BIOLUMINISCENCIA	115
10.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA	116
10.1.	Algunos conceptos metabólicos	117
11.	ELECTROPORACIÓN CON ExPERT GTx	118
12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	118
RESULTADOS		120
1.	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CAR-T ANTI-CD19 UNIVERSALES	120
1.1.	Optimización de la eficacia y seguridad de la edición génica de células T primarias humanas	120
1.1.1.	Eficacia	120
1.1.2.	Seguridad	125
1.2.	Combinación edición génica y vectores lentivirales para generar células ARI-CAR-T universales	130

1.3.	Estado metabólico de las células TCRKO ARI-CAR-T	132
1.4.	Análisis de la respuesta alogénica de las células TCRKO ARI-CAR-T	133
1.5.	Determinación de la actividad anti-leucémica de las células TCRKO ARI-CAR-T	135
1.5.1.	Estudios in vitro	135
1.5.2.	Ensayos preclínicos en modelos de ratón	140
1.6.	Adaptación del protocolo para generar células T TCRKO en un electroporador de uso clínico.....	145
2.	MEJORA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS CÉLULAS CAR-T UNIVERSALES MEDIANTE INTERVENCIÓN METABÓLICA	146
2.1.	Expansión de células T primarias en presencia de moduladores metabólicos	146
2.2.	Tratamiento de las células TCRKO ARI-CAR-T con los moduladores metabólicos	152
2.3.	Efecto de los moduladores metabólicos en la actividad antitumoral de las células TCRKO ARI-CAR-T	154
	DISCUSIÓN	162
	CONCLUSIONES.....	172
	CONCLUSIONS.....	174
	REFERENCIAS.....	176

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Señales involucradas en la activación de las células T naïve por parte de las células presentadoras de antígenos.....	41
Figura 2. Esquema de los marcadores de agotamiento y activación de las células T.....	44
Figura 3. Esquema de las principales rutas de señalización que regulan el metabolismo de las células T.	48
Figura 4. Esquema de los diferentes programas metabólicos entre células T naïve, memoria y efectoras.....	52
Figura 5. Resumen de las principales estrategias para la modificación génica de células T.	57
Figura 6. Características generales de las principales endonucleasas específicas usadas en edición genómica.....	58
Figura 7. Descripción general de las diferentes vías de reparación del ADN en la célula.....	60
Figura 8. Modificación y mecanismo de acción de las células CAR-T... ..	71
Figura 9. Factores que determinan la eficacia de la terapia CAR-T anti-CD19.....	81
Figura 10. Fuentes celulares y estrategias de edición genómica para generar productos CAR-T universales.....	98
Figura 11. Generación de células T TCRKO mediante electroporación de CRISPR/Cas9 como RNP (RNP _{TRAC}).....	122
Figura 12. Fenotipo de las células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9 (RNP _{TRAC}).....	124
Figura 13. Análisis del estado mitocondrial de las células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9 (RNP _{TRAC}).....	125
Figura 14. Análisis de <i>indels</i> en células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9.....	127
Figura 15. Análisis de grandes deleciones en el sitio de corte en células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9.....	129

Figura 16. Estandarización del protocolo para la generación de las células TCRKO CAR-T.....	130
Figura 17. Generación y caracterización de células ARI-CAR-T universales.....	131
Figura 18. Análisis de la actividad metabólica de las células ARI-CAR-T universales.....	133
Figura 19. Estudio de la respuesta alogénica de las células ARI-CAR-T universales.....	134
Figura 20. Actividad lítica de las células ARI-CAR-T universales.....	136
Figura 21. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición repetida al antígeno tumoral.....	137
Figura 22. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición muy frecuente con antígeno tumoral.....	139
Figura 23. Efecto de un ciclo de congelación-descongelación en las células ARI-CAR-T universales.....	140
Figura 24. Actividad antitumoral in vivo de las células ARI-CAR-T universales en un modelo de linfoma de Burkitt.....	142
Figura 25. Presencia de células Namalwa en diferentes tejidos.....	143
Figura 26. Caracterización fenotípica de las células ARI-CAR-T universales infiltradas en los diferentes órganos murinos.....	144
Figura 27. Generación de células T TCRKO usando un electroporador GMP.....	145
Figura 28. Análisis fenotípico de células T TCRKO tratadas con moduladores metabólicos.....	149
Figura 29. Análisis de marcadores de agotamiento de células T TCRKO tratadas con moduladores metabólicos.....	150
Figura 30. Estado metabólico de las células T TCRKO tratadas con moduladores metabólicos.....	151
Figura 31. Análisis fenotípico de células TCRKO ARI tratadas con moduladores metabólicos.....	153

Figura 32. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición frecuente con el antígeno tumoral en un modelo de linfoma..	155
Figura 33. Fenotipo de las células TCRKO ARI moduladas metabólicamente y estimuladas continuamente con las células diana..	157
Figura 34. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición frecuente con el antígeno tumoral en un modelo pancreático.	159
Figura 35. Representación gráfica de los resultados obtenidos al comparar las células ARI-CAR-T y TCRKO ARI-CAR-T	167
Figura 36. Proceso para implementar la terapia adoptiva con células CAR-T alogénicas universales moduladas metabólicamente.	170

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las diferentes generaciones del CAR.....	70
Tabla 2. Productos comerciales con células CAR-T.....	75
Tabla 3. Comparación entre la terapia CAR-T autóloga y alogénica.....	88
Tabla 4. Resumen de los ensayos clínicos con células CAR-T alogénicas para neoplasias hematológicas.....	95
Tabla 5. Descripción y secuencia de los oligonucleótidos usados en el análisis mutagénico.....	112

RESUMEN

RESUMEN

Las células T autólogas modificadas con receptores de antígeno quiméricos (CARs) han sido aprobadas como medicamentos de terapia avanzada (ATMPs) contra varias neoplasias malignas de tipo B. Sin embargo, su naturaleza autóloga impide su aplicación a todos los pacientes que la necesiten, así como la estandarización de esta terapia. Las células CAR-T alogénicas son una alternativa para simplificar este proceso complejo y lento. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la viabilidad (eficacia y seguridad) de la eliminación del TCR (TCRKO) para generar células CAR-T alogénicas universales. Además, hemos investigado la intervención metabólica con moléculas pequeñas como una estrategia para mejorar los productos de células CAR-T, incluidas las células TCRKO CAR-T. En concreto, el trabajo realizado se ha dividido en dos bloques principales:

Determinación de la eficacia y seguridad de la edición genómica para generar células CAR-T universales. Para ello se contó con la colaboración del Dr Manel Juan y su donación del CAR ARI-0001, un CAR α CD19 de segunda generación aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en el marco de la Exención Hospitalaria para el tratamiento de pacientes mayores de 25 años con leucemia linfoblástica aguda de células B Recidivante/Refractaria (R/R LLA-B).

En primer lugar, se analizó la eficacia y los potenciales problemas de seguridad que surgen tras la interrupción del locus *TRAC* utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Demostramos que el uso de CRISPR/Cas9 entregado como ribonucleopartículas (RNPs) permite una depleción en la expresión del TCR altamente eficiente (más del 80%) sin alteraciones significativas en el fenotipo de las células T. Sin embargo, también encontramos que la edición del locus *TRAC* puede conducir a grandes deleciones en el genoma, lo que indica un potencial riesgo de este procedimiento. Tal y como se esperaba, la eliminación del TCR en las células ARI-CAR-T impidió eficientemente las respuestas alogénicas.

Además, el procedimiento utilizado no alteró de manera significativa su fenotipo, manteniendo una actividad antitumoral similar *ex-vivo* e *in vivo* en comparación con células ARI-CAR-T sin editar (WT ARI-CAR-T cells). Estos resultados demuestran que, aunque todavía existen algunos riesgos de genotoxicidad, la interrupción del *TRAC* es una estrategia factible para la generación de células ARI-CAR-T universales y funcionales. En este sentido, nuestro siguiente paso será validar el proceso en condiciones de escalado y buenas prácticas de fabricación (GMP) para proponer un ensayo clínico y/o exención hospitalaria para el tratamiento de pacientes con linfomas o leucemias tipo B que hayan agotado otras opciones y que no puedan acceder al tratamiento con CAR-T comerciales.

Intervención metabólica con pequeñas moléculas para favorecer productos CAR-T enriquecidos en células T memoria. Por otro lado, en esta tesis también intentamos abordar uno de los problemas con los que se encuentran las terapias CAR-T actuales: su agotamiento/falta de persistencia antes de eliminar todas las células tumorales en los pacientes, especialmente importante en la terapia con células CAR-T alogénicas. En esta dirección, existe fuerte evidencia de que una mayor presencia de células T memoria, con alta capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad (células T madre memoria, T_{SCM}), se correlaciona directamente con una mejor respuesta terapéutica.

En base a estos trabajos, entramos en colaboración con el Prof. Pedro Romero, desarrollador de diversos procedimientos para reprogramar el fenotipo de las células T mediante intervención metabólica. En esta dirección estudiamos si la intervención metabólica durante la expansión *ex vivo* podría ser un método para mejorar la actividad antitumoral de las células TCRKO CAR-T alogénicas. En concreto, evaluamos dos inhibidores, uno para la enzima mitocondrial isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) y otro para el transportador mitocondrial de piruvato (MPC). Estos estudios relevaron un incremento en el fenotipo T_{SCM} en células WT y TCRKO ARI-CAR-T tratadas con el inhibidor para MPC (MPCi), aunque no con el inhibidor para IDH2 (IDH2i). La inhibición de MPC no comprometió la expansión de las células CAR-T ni la producción de

citoquinas. Las células ARI-CAR-T pre-tratadas con el MPCi mostraron una función efectora antitumoral superior, pero variable en función del modelo utilizado. Esta variabilidad en el incremento de la eficacia precisa ser investigada en modelos animales y, en función de los resultados, propondremos su futura aplicación en protocolos de generación de células CAR-T alogénicas.

ABSTRACT

ABSTRACT

Autologous T cells expressing chimeric antigen receptors (CARs) have been approved as advanced therapy medicinal products (ATMPs) against several type B malignancies. However, a main drawback comes from their autologous nature which limits the amount of patients that can be treated and precludes its standardization. Allogeneic CAR-T cells are an alternative to simplify this complex and time-consuming process. In this Doctoral Thesis, we have studied the feasibility (efficacy and safety) of TCR knockdown (TCRKO) to generate universal allogeneic CAR-T cells. In addition, we have investigated metabolic intervention with small molecules as a way to improve CAR-T cell products, including TCRKO CAR-T cells. Specifically, the work carried out has been divided into two main objectives:

Determination of genome editing efficacy and safety to generate Universal CAR-T cells. For this, we had the collaboration of Dr Manel Juan who donated the CAR ARI-0001, a second generation α CD19 CAR approved by the Spanish Agency for Medicines and Medical Devices (AEMPS) within the framework of Hospital Exemption for the treatment of patients older than 25 years with Relapsed/Refractory acute B cell lymphoblastic leukemia (R/R B-ALL).

First, the efficacy and potential safety concerns that arise after disruption of the *TRAC* locus using the CRISPR/Cas9 system were analyzed. We show that the use of CRISPR/Cas9 delivered as ribonucleoparticles (RNPs) allows highly efficient TCR depletion (over 80%) without significant alterations in T cell phenotype. However, we have also found that efficient TCRKO can lead to on-target large deletions in the genome, indicating a potential risk of this procedure. As expected, TCR elimination of ARI-CAR-T cells efficiently prevented allogeneic responses. Importantly, the procedure did not significantly alter ARI-CAR-T cell phenotype, while maintaining a similar antitumor activity *ex vivo* and *in vivo* compared to unedited ARI-CAR-T cells (WT ARI-CAR-T cells). These results demonstrate that, although some risks of

genotoxicity still exist, *TRAC* disruption is a feasible strategy for the generation of functional universal ARI-CAR-T cells. In this sense, our next step will be to validate the process under escalation and good manufacturing practices (GMP) to propose a clinical trial and/or hospital exemption for the treatment of patients with type B lymphomas or leukemias who have no other options and who can not access commercial CAR-T therapy.

Metabolic intervention with small molecules to favour CAR-T products enriched in memory T cells. On the other hand, in this thesis we have also tried to address one of the problems that current CAR-T therapies encounter: their exhaustion/lack of persistence before eliminating all the tumor cells in patients, especially important in allogeneic CAR-T cell therapies. In this direction, there is strong evidence that a greater presence of memory T cells, with a high capacity for self-renewal and pluripotency (T stem cell memory, T_{SCM}), is directly correlated with a better therapeutic response.

Based on these studies, we entered in collaboration with Prof. Pedro Romero, who had developed various procedures to reprogram T cell phenotype through metabolic intervention. In this direction, we studied whether metabolic intervention during *ex vivo* expansion could be a method to improve the antitumor activity of allogeneic TCRKO CAR-T cells. Specifically, we evaluated two inhibitors, one for the mitochondrial enzyme isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and another for the mitochondrial pyruvate transporter (MPC). These studies revealed an increase in T_{SCM} phenotype in WT and TCRKO ARI-CAR-T cells treated with the inhibitor for MPC (MPCi), although not with the inhibitor for IDH2 (IDHi). MPC inhibition did not compromise CAR-T cell expansion or cytokine production. ARI-CAR-T cells pre-treated with MPCi showed a higher antitumor effector function which varies depending on the model used. This variability in increasing efficacy needs to be investigated in animal models and, based on the results, we will propose its future application in protocols for the generation of allogeneic CAR-T cells.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
AICD	Muerte celular inducida por activación, del inglés <i>Activation-Induced Cell Death</i>
AG	Adición génica
Akt	Proteína quinasa B, del inglés <i>protein kinase B</i>
Alt-EJ	Unión de extremos alternativa, del inglés <i>Alternative End-Joining</i>
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP, del inglés <i>AMP-activated Protein Kinase</i>
AP1	Complejo proteico adaptador 1, del inglés <i>Adaptor protein complex-1</i>
AP2	Complejo proteico adaptador 2, del inglés <i>Adaptor protein complex-2</i>
APC	Célula presentadora de antígenos, del inglés <i>Antigen Presenting Cell</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNcr	ARN-CRISPR
ARNg	ARN guía
ARNm	ARN mensajero
ARNsg	ARN guía único, del inglés <i>single guide</i>
ARNtracr	ARN CRISPR transactivante, del inglés <i>trans-activating CRISPR</i>
ATMP	Medicamento de terapias avanzadas, del inglés <i>Advanced Therapy Medicinal Product</i>
ATP	Adenosina trifosfato, del inglés <i>Adenosine Triphosphate</i>

BATF	Factor de transcripción de cremallera de leucina básica similar a ATF, del inglés <i>Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor</i>
BCMA	Antígeno de maduración de las células B, del inglés <i>B-Cell Maturation Antigen</i>
BiTEs	Anticuerpos biespecíficos de unión a células T, del inglés <i>Bi-specific T-cell engagers</i>
B2M	β 2-microglobulina
BTLA	Atenuador de linfocitos B y T, del inglés <i>B and T Lymphocyte Attenuator</i>
CAR	Receptor de antígeno quimérico, del inglés <i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CAR-T	Célula T expresando el CAR
CD	Antígenos de diferenciación, del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>
CF	Citometría de flujo
CFSE	Fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína, del inglés <i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
CMV	Citomegalovirus
CRES	Síndrome de encefalopatía asociada a CAR, del inglés <i>CAR-Related Encephalopathy Syndrome</i>
CRISPR/Cas9	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas/nucleasa 9 asociada, del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/associated nuclease protein 9 system</i>
CRS	Síndrome de liberación de citoquinas, del inglés <i>Cytokine Release Syndrome</i>
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico, del inglés <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CTV	Del inglés <i>Cell Trace Violet</i>
DCK	Desoxicitidina quinasa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

dPCR	Reacción en cadena de la polimerasa digital, del inglés <i>digital polymerase chain reaction</i>
DSB	Rotura de doble cadena, del inglés <i>Double Strand Break</i>
ECAR	Tasa de acidificación extracelular, del inglés <i>Extracellular Acidification Rate</i>
EG	Edición Genómica
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada, del inglés <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
EMA	Agencia Europea del Medicamento, del inglés <i>European Medicines Agency</i>
FADH2	Flavín adenín dinucleótido en su forma reducida, del inglés <i>reduced Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FAO	Beta-oxidación de ácidos grasos, del inglés <i>fatty acid oxidation</i>
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos, del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
Glut-1	Transportador de glucosa-1
GMP	Buenas prácticas de fabricación, del inglés <i>Good Manufacturing Practice</i>
GOI	Gen de interés, del inglés <i>Gene Of Interest</i>
γ-RVs	Vectores γ-retrovirales
GSK3B	Enzima glucógeno sintasa quinasa 3B, del inglés <i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
hEF1α	Factor de elongación eucariótico humano 1 alfa, del inglés <i>human Eukaryotic Translocation Elongation Factor 1α</i>
HLA	Antígeno leucocitario humano, del inglés <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HLA II	Antígeno leucocitario humano de clase II, del inglés <i>Human Leukocyte Antigen Class II</i>
HLA I	Antígeno leucocitario humano de clase I, del inglés <i>Human Leukocyte Antigen Class I</i>

HMGB1	Proteína de alta movilidad, del inglés <i>High-Mobility Group Box 1</i>
HR	Recombinación homóloga, del inglés <i>Homologous Recombination</i>
ICAM	Molécula de adhesión intracelular, del inglés <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICANS	Síndrome de neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunológicas, del inglés <i>Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome</i>
ICOS	Coestimulador inducible de célula T, del inglés, <i>Inducible T-cell Co-stimulator</i>
IDH2	Deshidrogenasa de isocitrato, del inglés <i>Isocitrate Dehydrogenase 2</i>
IDH2i	Inhibidor de IDH2
Indels	Inserciones y/o deleciones, del inglés <i>insertions/deletions</i>
INFγ	Interferón gamma
IRF4	Factor 4 regulador del interferón, del inglés <i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
ITAM	Motivo de activación de tirosina de receptor inmunológico, del inglés <i>Immune-receptor Tyrosine-based Activation Motif</i> ,
JAK	Quinasa Janus, del inglés <i>Janus kinase</i>
LAG3	Gen 3 de activación del linfocito, del inglés <i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>
LBDCG	Linfoma B difuso de células grandes
LCM(-B)	Linfoma de Células (B) del Manto
LF	Linfoma Folicular
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función del linfocito, del inglés <i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA(-B/T)	Leucemia Linfoblástica Aguda (de células B/T)
LLB-T	Linfoma Linfoblástico de células T
LLC(-B)	Leucemia Linfocítica Crónica (de células B)

LLCP	Linfoma Linfocítico de Células Pequeñas
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LNH(-B)	Linfoma No-Hodgkin (de células B)
LTR	Repetición larga terminal, del inglés <i>Long Terminal Repeat</i>
MeFI	Intensidad mediana de fluorescencia, del inglés Median Fluorescence Intensity
MG	Del inglés <i>MitoTracker Green</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex class II</i>
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex class I</i>
MM	Mieloma Múltiple
MMEJ	Unión de extremos mediada por microhomología, del inglés <i>Microhomology-Mediated End Joining</i>
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés <i>Multiplicity of Infection</i>
MoMLV	Virus de la leucemia murina de Moloney, del inglés <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MPC	Transportador de piruvato mitocondrial, del inglés Mitochondrial Pyruvate Carrier.
MPCi	Inhibidor de MPC
MSCV	Virus de células madre murinas, del inglés <i>Murine Stem Cell Virus</i>
mTOR	Diana de la rapamicina en células de mamífero, del inglés <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NADH	Nicotin adenin dinucleótido en su forma reducida, del inglés <i>reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NBCDP	Neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides
NFAT	Factor nuclear de células T activadas, del inglés <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas, del inglés <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHEJ	Unión de extremos no homólogos, del inglés <i>Non Homologous End-Joining</i>
NK	Células asesinas naturales, del inglés <i>Natural Killer cells</i>
NKT	Células T asesinas naturales, del inglés <i>Natural killer T cells</i>
NLuc	Nanoluciferasa
NMPA	<i>China's National Medical Products Administration</i>
NR4A	Grupo A de la subfamilia 4 de receptores nucleares, del inglés <i>Nuclear Receptor subfamily 4^a</i>
NT	No transducido
OCR	Tasa de consumo de oxígeno, del inglés <i>oxygen consumption rate</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXHOS	Fosforilación oxidativa, del inglés <i>Oxidative Phosphorylation</i>
PAM	Motivo adyacente de protoespaciador, del inglés <i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PB	<i>PiggyBac</i>
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD1	Proteína 1 de muerte celular programada, del inglés <i>Programmed cell Death protein 1</i>
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada, del inglés <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PGK	Fosfoglicerato quinasa humana, del inglés <i>Phosphoglycerate Kinase</i>
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa, del inglés <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PMBCs	Células mononucleares de sangre periférica, del inglés <i>Peripheral Mononuclear Blood Cells</i>

PPARγ	Receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas, del inglés <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
p/s	Penicilina/Estreptomocina
RAG	Gen activador de recombinación, del inglés <i>Recombination-Activating Gene</i>
RI	Receptor Inhibidor
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
R/R	Recidivante/Refractario
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
ScFV	Fragmento variable de cadena sencilla, del inglés <i>Single-chain Variable Fragment</i>
SFFV	Virus formador de focos en el bazo, del inglés <i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SI	Sistema Inmunológico
SIN	Auto-inactivables, del inglés <i>self-inactivating</i>
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
S1P	Metabolito esfingosina-1-fosfato, del inglés <i>Sphingosine-1-phosphate</i>
SRC	Capacidad respiratoria máxima, del inglés <i>Spare Respiratory Capacity</i>
SSA	Alineamiento de hebra única, del inglés <i>Single Strand Annealing</i>
STAT5	Transductor de señales y activador transcripcional 5, del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
TAA	Antígeno asociado a tumor, del inglés <i>Tumor Associated Antigen</i>
TALEN	Nucleasa de actividad similar al activador de transcripción, del inglés <i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TCA	Terapia Celular Adoptiva

T_{CM}	Célula T memoria central, del inglés <i>T central memory cell</i>
TCR	Receptor de células T, del inglés <i>T Cell Receptor</i>
T_{EM}	Célula T memoria efectora, del inglés <i>T Effector Memory cell</i>
T_{EF}	Célula T Efectora
TFGβ	Factor de crecimiento transformante β, del inglés <i>Transforming growth factor β</i>
Tfh	Célula T colaboradora folicular, del inglés <i>T follicular helper cell</i>
Th	Célula T colaboradora, del inglés <i>T helper cell</i>
ThGM	Célula T colaboradora productora de GM-CSF, del inglés <i>GM-CSF-producing T helper</i>
TMRM	Éster metílico tetrametilrodamina, del inglés <i>Tetramethylrhodamine, methyl ester</i>
TIGIT	Inmuno-receptor con un dominio Ig y un dominio ITIM, del inglés <i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumores, del inglés <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TIM3	Inmunoglobulina y proteína mucina 3 de células T, del inglés <i>T cell Immunoglobulin domain and Mucin domain 3</i>
TIRs	Repeticiones invertidas terminales, del inglés <i>Terminal Inverted Repeats</i>
T_M	Célula T memoria
TM	Dominio transmembrana
T_N	Célula T vírgen, del inglés <i>T naïve cell</i>
TNFα	Factor alfa de necrosis tumoral, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TNFβ	Factor beta de necrosis tumoral, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor beta</i>
TNFR-I	Receptor del factor de necrosis tumoral 1, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>

TOX	Proteína de caja de grupo de alta movilidad
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral, del inglés <i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> ,
Treg	Célula T reguladora, del inglés <i>regulatory T cell</i>
TRUCK	Célula CAR-T de cuarta generación, del inglés <i>T cell Redirected for antigen-Unrestricted Cytokine initiating Killing</i>
TSA	Antígeno específico de tumor, del inglés <i>Tumor Specific Antigen</i>
T_{scM}	Célula T madre memoria, del inglés <i>T stem cell memory</i>
UbiC	Ubiquitina C
UCAR-T	Célula CAR-T universal, del inglés <i>universal CAR-T cell</i>
VAAr	Vectores basados en virus adenoasociados recombinantes
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
VLs	Vectores Lentivirales
VSV-G	Glicoproteína G de la envoltura fusogénica del virus de la estomatitis vesicular, del inglés <i>Glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus</i>
ZFN	Nucleasa dedo de zinc, del inglés <i>zinc-finger nuclease</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. INMUNOLOGIA Y CÁNCER

La inmunología es la ciencia que estudia la defensa del cuerpo frente a una infección y su origen se atribuye a Edward Jenner (1749-1823), pionero en el concepto de vacunación. En 1796, Jenner demostró que la inoculación con viruela bovina podría proteger contra la viruela, una enfermedad mortal en la época, creando así la primera vacuna del mundo. Sin embargo, no fue hasta principios del siglo XX que se relacionó a la inmunología con el cáncer. En 1907, Paul Ehrlich sugirió una vigilancia inmunológica del cáncer así como un control inmunológico de la enfermedad (Kasten, 1996). Finalmente en 1970, Frank MacFarlane Burnet, basándose en las hipótesis de Lewis Thomas, escribió la teoría de la inmunovigilancia (Ribatti, 2017), la cual hipotetiza que los neo-antígenos expresados por las células tumorales inducen la activación inmunológica y la eliminación del tumor.

Dado que el sistema inmunológico (SI) protege al hospedador y modifica al tumor al mismo tiempo, Dunn and Schreiber acuñaron el término de inmunoedición del cáncer, compuesta de tres fases.

(1) Eliminación del tumor. En esta fase el daño ocasionado en los tejidos colindantes al tumor genera señales inflamatorias provocando el reclutamiento de las células de la inmunidad innata: células *Natural Killer* (NK), *Natural Killer T* (NKT), células T gammadelta ($T\gamma\delta$), macrófagos y células dendríticas. Las células NK y macrófagos ejercen una función citolítica, a través de la expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) y la producción de factores líticos como perforinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno. Mientras, las células dendríticas van a migrar a los nódulos linfáticos donde presentan antígenos tumorales a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (denominado antígeno leucocitario humano (HLA) en humanos) de clase II a células T CD4+, generando células T CD4+ específicas de tumor, y estas a su vez activan células T CD8+ específicas del tumor. Ambas siguiendo un

gradiente de quimiocinas migran al foco del tumor, donde reconocen específicamente y destruyen células tumorales.

(2) Equilibrio. La segunda fase corresponde a un estado de equilibrio entre el SI y el tumor. Durante esta fase el tumor desarrolla nuevas mutaciones que hacen al tumor cada vez menos inmunogénico y/o más resistente al ataque del SI.

(3) Escape. En esta fase, las mutaciones acumuladas en el tumor evaden el reconocimiento por el SI o bloquean su actividad, lo que le permite expandirse de forma descontrolada (Dunn et al., 2002).

Las vacunas dieron paso al desarrollo de la inmunoterapia, la cual aprovecha la capacidad natural del sistema inmunitario para detectar y destruir células anormales. Tras esto, han surgido nuevas estrategias, como la infusión de anticuerpos para bloquear interacciones inmunitarias no deseadas, inducir la muerte mediada por anticuerpos o mejorar las respuestas efectoras bloqueando los receptores inhibidores (RIs) de las células T (inhibidores de puntos de control), siendo esta última particularmente eficaz (Korman et al., 2022).

Otra estrategia con especial interés es la basada en anticuerpos biespecíficos, denominados BiTEs (del inglés, *Bi-specific T-cell engagers*), que por un lado se unen a las células T y por otro a la célula tumoral, haciendo que las células T eliminen a las células tumorales, sin necesidad de que ellas mismas reconozcan el antígeno tumoral (Einsele et al., 2020). También, se han diseñado virus capaces de reconocer y lisar específicamente a las células tumorales, lo que se denomina virus oncolíticos (Lin et al., 2023).

Desde el nacimiento de la terapia génica, se ha buscado poder aplicarla para mejorar la eficacia y especificidad de las estrategias de inmunoterapia. Esto se ha perseguido de múltiples formas, desde la modificación genética de células presentadoras de antígeno para lograr respuestas tumor-específicas y duraderas, a la modificación genética de las propias células tumorales para su uso como vacunas. Sin embargo, ha sido la modificación genética de las células T la que ha logrado

revolucionar el campo de la inmunoterapia. Para poder entender el porqué de este éxito, en primer lugar, hay que entender el papel de las células T en la inmunidad tumoral.

1.1. Las células T: principales actores en la inmunidad tumoral

1.1.1. Células T *naïve*

Las células T *naïve* (T_N) son las células T que han completado su desarrollo en el timo, pero aún no han interactuado con su antígeno. Estas migran a los órganos linfoides secundarios donde circulan entre el corriente linfático y sanguíneo. La migración de las células T_N a los órganos linfoides está mediada por moléculas de adhesión como son las selectinas, siendo la L-selectina (CD62L) una de las más importantes en mediar este proceso de *homing*. Otras moléculas importantes en mediar las interacciones de la célula T con otras células son las integrinas, como el antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1). En el proceso de entrada a un nódulo linfático desde el torrente sanguíneo, es necesario un gradiente de quimiocinas (Picker & Butcher, 1992; von Andrian & Mempel, 2003) como CCL21, la cual se une al receptor de quimiocinas CCR7, expresado en células T_N .

Las células T_N se dividen en dos clases dependiendo del co-receptor que portan, células T_N CD4+ o células T_N colaboradoras y células T_N CD8+ o células T_N citotóxicas. Las células T_N CD4+ se pueden diferenciar a diferentes tipos de células T colaboradoras: T *helper* 1 (Th1), Th2, Th17, Th9, Th22, Th3, ThGM (células T colaboradoras productoras de GM-CSF), Tfh (células T colaboradoras foliculares), o a células T reguladoras (Treg). Cada uno de estas subpoblaciones expresa combinaciones específicas de receptores, factores de transcripción y citoquinas (Zhu & Zhu, 2020).

Cuando una célula T_N reconoce su antígeno específico presentado por el complejo MHC de Clase II, en el caso de las células T CD4+, o de clase I, en el caso de las CD8+, en la membrana de las células presentadoras de antígenos (APCs), sufre expansión clonal y diferenciación dando lugar a células T efectoras (T_{EF}) y células memoria (T_M) con la misma

especificidad antigénica. Las células T_{EF} vuelven a la circulación para migrar al sitio de inflamación. Este proceso se denomina respuesta inmunológica mediada por célula primaria (Murphy, 2017).

1.1.1.1. Receptor de células T (TCR)

Las células T interactúan con las moléculas de MHC a través del receptor de células T (TCR). El TCR es un complejo formado normalmente por dos cadenas polipeptídicas, la cadena α y β (células T $\alpha\beta$), aunque existe una minoría de células T cuyo TCR está formado por las cadenas γ y δ (células T $\gamma\delta$). Cada cadena está compuesta de dos dominios extracelulares: un dominio constante (C) y otro variable (V). Los dominios constantes participan en el correcto ensamblaje del complejo, junto con las subunidades CD3: CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , y CD3 ζ (Cantrell, 1996; Clevers et al., 1988). Los dominios variables determinan el reconocimiento del complejo MHC-péptido.

Las colas citoplasmáticas de las moléculas CD3 contienen motivos de activación de tirosina (ITAM) que median la transducción de la señal y la activación de la célula T mediante la unión de proteínas con el dominio SH2. En el caso de células no activadas ("*resting*"), estos dominios ITAMs son reconocidos por los complejos de proteínas adaptadoras AP1 y AP2, responsables de la internalización y reciclado del complejo TCR, lo que permite una expresión estable (Dietrich et al., 1997).

Una célula T tiene aproximadamente 40 000-30 000 moléculas de TCR idénticas en su superficie, aunque se ha visto que para inducir una correcta activación tan solo es necesario la unión de 200-400 moléculas a su ligando (MHC-péptido) (Labrecque et al., 2001). La afinidad y avidéz entre el TCR y el complejo MHC-péptido son insuficientes para mantener una unión estable. Por ello, tras la unión, las células T van a expresar integrinas, como LFA-1, que se unen fuertemente a sus receptores en las APCs, los ICAMs, moléculas de adhesión intracelular. Esta interacción puede durar hasta 20 horas y va a permitir que se forme la sinapsis inmunológica.

La interacción entre el TCR y su ligando resulta en la regulación a la baja del complejo TCR (Labrecque et al., 2001; Liu et al., 2000; San Jose et al., 2000; Schonrich et al., 1991; Valitutti et al., 1995). Este hecho ha generado varios modelos para intentar explicar qué desencadena esta bajada (San Jose et al., 2000; Valitutti et al., 1995). El más aceptado expone que la unión específica del TCR a su ligando, así como la unión simultánea de otras moléculas a sus ligandos, va a generar señales intracelulares que median la retención o degradación de los receptores a través de lisosomas o proteasomas, previniendo así un reciclado intracelular del TCR (Escors et al., 2011; Liu et al., 2000), como ocurre en células no activadas (Minami et al., 1987). Este mecanismo permite controlar la activación de las células T, limitando la transducción de señales y evitando una respuesta excesiva, lo que previene daños en tejidos sanos o el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Cai et al., 1997; Schonrich et al., 1991).

1.1.2. Señales en la activación de las células T *naïve*

La activación de la célula T está altamente regulada y requiere de 3 señales en el marco de la sinapsis inmunológica, una estructura que se genera a los pocos minutos de la unión del TCR a su ligando. La señal 1 se produce tras la interacción del TCR, así como del co-receptor (CD4 o CD8) con su MHC-péptido específico, dando lugar a una serie de transducción de señales esenciales para la activación. La señal 2 está mediada por la unión de moléculas co-estimuladoras a sus receptores en la célula T, que pueden actuar como co-estimuladores o inhibidores. La señal 3 está involucrada en dirigir la diferenciación de las células T a las diferentes subpoblaciones mencionadas anteriormente, y esta mediada principalmente por citoquinas liberadas por la APC (**Figura 1**). La integración de estas señales determinará el grado y tipo de respuesta de las células T efectoras. La falta de la señal 2 lleva a la célula T a un estado de anergia (Schwartz, 2003).

Los receptores co-estimuladores que median la segunda señal van a promover la supervivencia y expansión de las células T, como es el receptor CD28, el cual se une a las moléculas co-estimuladoras de la

familia B7 (CD80/CD86) en la APC. Esta unión, entre otras cosas, induce la síntesis de la citoquina IL-2, así como de la cadena α de su receptor (CD25) por las células T. IL-2 es crucial para la supervivencia y diferenciación de células T. Otros receptores co-estimuladores son ICOS (co-estimulador inducible), CD27, CD40L, 4-1BB (CD137) u OX-40 (CD134).

Dentro de los receptores inhibidores encontramos: CTLA4 (proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos, o CD152), que se une también a las moléculas B7 pero con una avidéz mayor; PD1 (proteína de muerte programada 1) que interacciona con PD-L1; LAG3 (gen 3 de activación del linfocito, o CD223), cuyos ligandos son FGL-1, Gal-3, LSECtin y α -syn; TIGIT (inmuno-receptor con un dominio Ig y un dominio ITIM, también conocido como Vstm3) que interacciona con los miembros de su propia familia (familia de receptores poliovirus); o TIM3 (inmunoglobulina y proteína mucina 3 de células T, también conocido como CD366 Y HAVCR2), que puede unirse a galectina-9, fosfatidilserina y HMGB1 (proteína de alta movilidad) (Andrews et al., 2019) (**Figura 2**). La unión de estos receptores a sus ligandos va a inhibir la activación de la célula T, limitando su proliferación. Estos RIs representan un punto de control fundamental para mantener la homeostasis inmunológica y prevenir la autoinmunidad (Francisco et al., 2010).

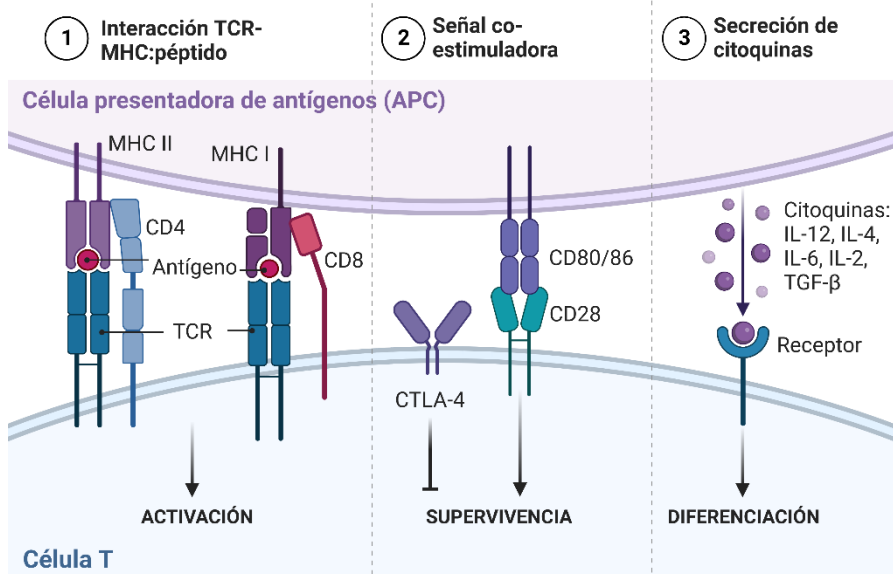


Figura 1. Señales involucradas en la activación de las células T *naïve* por parte de las células presentadoras de antígenos. La unión del TCR, junto con su co-receptor (CD4/CD8) al complejo MHC (MHC II/MCH I)-péptido (antígeno) transmite la señal 1 a la célula T. La activación efectiva de las células T_N requiere de una segunda señal, la señal coestimuladora, que debe ser administrada por la misma célula presentadora de antígeno (APC). En este ejemplo, la molécula CD28 en la célula T se une a moléculas B7 en la APC emite la señal 2, cuyo efecto neto es el aumento de la supervivencia y proliferación de la célula T que ha recibido la señal 1. Por último, otras señales, principalmente citoquinas, conducen a la diferenciación de la célula T a las diferentes subpoblaciones (señal 3). Las células T activadas expresan niveles elevados de CTLA4, que tiene una mayor afinidad que CD28 por las moléculas B7 y, por lo tanto, se une a la mayoría o a todas las moléculas B7. CTLA4 por lo tanto sirve para regular la fase proliferativa de la respuesta de las células T. *Figura creada con BioRender.com.*

1.1.3. Citotoxicidad mediada por células T

Las células T citotóxicas van a reconocer específicamente a su antígeno a través del TCR, lo que provoca una estrecha unión célula-célula formando la sinapsis inmunológica, que finaliza con la inducción de la apoptosis de la célula diana.

El mecanismo principal para la inducción de la apoptosis es la liberación dependiente de calcio de gránulos citotóxicos que contienen moléculas citotóxicas como perforinas, granzimas (A, B, H, K y M) o granulinsina (Yasukawa et al., 2000). Las células T citotóxicas también pueden inducir

la apoptosis de sus células diana de una manera indirecta, mediante la liberación de citoquinas como el factor beta de necrosis tumoral (TNF β) el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) e interferón gamma (INF γ). Estos factores van a activar principalmente a macrófagos (Salim et al., 2016). Además, TNF α puede inducir directamente la apoptosis de las células diana a través de la unión con su receptor TNFR-I. Otro mecanismo consiste en las interacciones a través de Fas (también denominada CD95, APO-1 o TNFRSF6) a su ligando, FasL, lo que resulta en la activación de una cascada de caspasas en la célula diana. Esta ruta de señalización Fas/FasL juega también un papel muy importante en la homeostasis, al inducir la muerte de los linfocitos T tras sucesivas activaciones (mecanismo conocido como muerte inducida por activación, AICD), (Waring & Mullbacher, 1999).

1.1.4. Diferenciación de las células T

Como hemos comentado tras la estimulación de las células T por su antígeno, la señalización del TCR activa un programa intrínseco de la célula que guía la diferenciación de las células T en células T_{EF} citotóxicas capaces de eliminar el antígeno. Después del pico de expansión de las células T_{EF} y la eliminación del antígeno específico, la mayoría de las células T_{EF} mueren, con la excepción de una pequeña cantidad de células T_M que sobreviven y brindan protección a largo plazo contra el antígeno (Hammarlund et al., 2003).

Múltiples estudios en ratones, macacos y humanos han permitido la identificación de las diferentes subpoblaciones de células T_M. En primer lugar, se usaron los marcadores CD27 y CD45RA, identificando a las células T_N como CD45RA+CD27+, a las células T_M como CD45RA-CD27+ y a las células T_{EF} efectoras como CD45RA+CD27- (Hamann et al., 1997). Dentro de las células T_M se diferenció entre células T memoria central (T_{CM}), que expresan CCR7 y CD62L, moléculas de *homing* a los nódulos linfáticos, y las células T memoria efectoras (T_{EM}), CCR7-CD62L-, que migran preferentemente a los tejidos periféricos y dan lugar rápidamente a células T_{EF}. Dado el hecho de que las células T_{CM}

presentan telómeros más largos y que tienen menor capacidad para expresar moléculas efectoras, se propuso que las células T_{EM} se generan a partir de las células T_{CM} (Sallusto et al., 1999). Posteriormente, se identificó una nueva subpoblación de células T_M, denominada células T madre memoria (T_{SCM}), por presentar propiedades similares a las de las células madre, como son la alta capacidad de auto-renovación y pluripotencia. Además, las células T_{SCM} presentan una capacidad extraordinaria de persistencia a largo plazo (Biasco et al., 2021; Fuertes Marraco et al., 2015). Las células T_{SCM} mantienen un perfil de expresión de genes muy similar a las células T_N, siendo CD45RA+CD45RO-CRR7+CD62L+CD27+CD28+, diferenciándose en la expresión de CD95, que es altamente expresado por las células memoria (Gattinoni et al., 2011).

La citometría de flujo multiparamétrica y las nuevas tecnologías de secuenciación han permitido establecer que la diferenciación de las células T memoria sigue un modelo progresivo: tras la activación de las células T_N, estas progresivamente se diferencian en las diferentes subpoblaciones memoria (T_{SCM} → T_{CM} → T_{EM}) hasta dar lugar finalmente a células T_{EF} (Cieri et al., 2015; Roberto et al., 2015). Por tanto, solo las células T_N y T_{SCM} son capaces de reconstituir el completo abanico de células T memoria y efectoras.

1.1.5. Disfunción y agotamiento de las células T

Cuando las células T se exponen de manera crónica al mismo antígeno, pueden ocurrir alteraciones sustanciales en la activación y diferenciación de estas, lo que lleva a una "disfunción" o "agotamiento" de las mismas. Podemos encontrar diferentes descripciones de qué es el estado de agotamiento por algunos de los autores más célebres en el campo de la inmunología y oncología de las últimas décadas en (Blank et al., 2019). En general, el estado de agotamiento está caracterizado por un conjunto de alteraciones transcripcionales, epigenéticas y metabólicas (Gennert et al., 2021).

Las células T agotadas presentan una pérdida de funciones efectoras, como la producción de citoquinas y la proliferación. Además, presentan altos niveles de expresión de múltiples receptores inhibidores como PD1, TIM3, LAG3, BTLA (atenuador de linfocitos B y T), CTLA4, TIGIT (**Figura 2**) o proteínas como CD39, un marcador asociado con el agotamiento terminal (Gupta et al., 2015). Las células agotadas también presentan un escenario epigenético único, con un incremento en la presencia de enzimas que catalizan la metilación del ADN (DNMT1, DNMT3 o TET2), y un programa transcriptómico alterado orquestado por el factor nuclear de células T activadas (NFAT). Tras una estimulación continua, NFAT aumenta la expresión de factores de transcripción requeridos para entrar en un estado de anergia, como son TOX (proteína de caja de grupo de alta movilidad), NR4A (grupo A de la subfamilia 4 de receptores nucleares), IRF4 (factor 4 regulador del interferón), BATF (factor de transcripción de cremallera de leucina básica, similar a ATF) o HELIOS (revisado en (Pietrobon et al., 2021) (**Figura 3**).

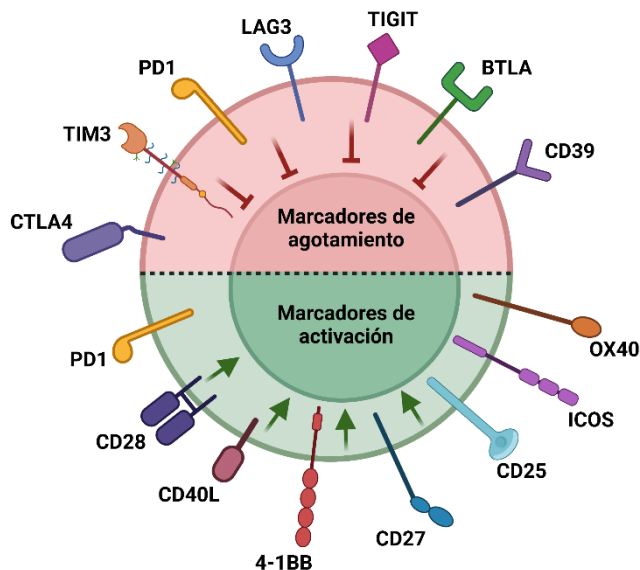


Figura 2. Esquema de los marcadores de agotamiento y activación de las células T. Algunos de los receptores inhibidores están regulados positivamente de manera similar tras la activación de las células T como un mecanismo de modulación de la señalización co-estimuladora. Esto sugiere que la expresión de los receptores inhibitorios por sí solos no es suficiente para distinguir entre las células T agotadas y activadas. *Figura adaptada de Pietrobon y cols., 2021. Creada con BioRender.com.*

1.2. EL PERFIL METABÓLICO DE LAS CÉLULAS T Y SU IMPLICACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

1.2.1. Vías metabólicas de las células T

A nivel celular, las moléculas de adenosina trifosfato (ATP) constituyen la fuente y almacenamiento de energía. Estas pueden ser generadas a través de dos rutas metabólicas, la glucólisis y la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Dependiendo de las necesidades celulares, el metabolismo puede ser anabólico, síntesis de macromoléculas que permitan el crecimiento celular, o catabólico, rotura de macromoléculas para la producción de energía. Aunque anabolismo y catabolismo son dos procesos contrarios, es necesario que funcionen de forma conjunta y armónica para mantener la homeostasis energética.

La glucosa constituye la fuente primaria para la síntesis de energía celular. La oxidación de la glucosa por la vía glucolítica genera piruvato, este metabolito puede ser descarboxilado en la matriz de la mitocondria generando acetil coenzima A (acetil-CoA) que constituye el sustrato de inicio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (también conocido como ciclo de Krebs), el cual proporciona las coenzimas NADH (nicotín adenín dinucleótido en su forma reducida) y FADH₂ (flavín adenín dinucleótido en su forma reducida), así como precursores de ciertos aminoácidos y ácidos grasos.

El poder reductor generado se emplea para la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Esta vía es muy eficiente, siendo capaz de producir hasta 10 veces más de ATP por molécula de glucosa que la glucólisis (Chen et al., 2009). En caso de que la concentración de oxígeno sea insuficiente, el piruvato se reduce en el citoplasma generando ácido láctico mediante un proceso conocido como fermentación. Aparte de la glucosa, las células T pueden utilizar los carbonos de aminoácidos, mediante la desaminación oxidativa, y lípidos, mediante la beta-oxidación de ácidos grasos (FAO), para generar acetil-CoA.

1.2.2.Principales rutas que regulan el metabolismo y la actividad de las células T

Durante la interacción entre las células T y las células diana, se produce la transducción de una serie de señales que regulan la diferenciación, expansión y persistencia de las células T. Las principales vías implicadas en esta red de señalización son (**Figura 3**):

1.2.2.1. PI3K/Akt/mTOR

La ruta de señalización PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B) se encuentra en todos los tipos celulares y tiene un papel muy importante en la proliferación, supervivencia, diferenciación, migración y metabolismo celular (Oak & Fruman, 2007). Uno de los principales efectores de esta ruta es la quinasa mTOR (diana de la rapamicina en células de mamífero) conocida por ser un sensor del estado energético de la célula, por lo que tiene un papel fundamental en el crecimiento celular.

En las células T, la ruta PI3K/Akt/mTOR constituye un eje regulador del tráfico y diferenciación a través de la regulación del transcriptoma celular. Tras la activación de las células T a través de este eje, se induce la expresión del transportador de glucosa-1 (Glut-1) y aumenta la proliferación de las células T y la producción de citoquinas (Salmond, 2018). Además, la activación de la vía mTOR conduce a la expresión de reguladores transcripcionales aguas abajo como HIF-1 α y c-Myc, lo que aumenta la expresión de receptores inhibidores en las células T (Le Bourgeois et al., 2018). La expresión constitutiva de Akt incrementa la proporción T-bet/Eomes, factores de transcripción de la familia *T-box*, favoreciendo la diferenciación terminal de las células activadas. Akt también va a prevenir la diferenciación hacia células T memoria inhibiendo la actividad de los factores de transcripción FOX, Foxo-1 y Foxo-3. Foxo-1 regula positivamente la expresión de TCF7, IL-7R, CCR7, KLF2 y CD62L, proteínas relacionadas con la supervivencia y persistencia de células T memoria, mientras que reprime la expresión de Tbet y Granzima B (Tejera et al., 2013).

mTOR es altamente regulado por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta quinasa se activa cuando el ratio AMP:ATP es elevado y puede incrementar la FAO y al mismo tiempo inhibir la actividad de mTOR. AMPK también influye en la homeostasis mitocondrial promoviendo el recambio mitocondrial a través del factor de transcripción PGC1 α (coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas) (E. H. Ma et al., 2017). PGC1 α es un nodo regulador de la biogénesis mitocondrial y modula la OXPHOS y la FAO (Dumauthioz et al., 2021; Fernandez-Marcos & Auwerx, 2011).

Otras rutas de señalización importantes en el seno de las células T con las que la ruta PI3K/Akt interacciona son: la ruta canónica Wnt/ β -catenina, la ruta del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la ruta quinasa Janus/transductor de señales y activador transcripcional 5 (JAK/STAT5) (Delgoffe et al., 2011; Manning & Cantley, 2007; Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003).

1.2.2.2. Wnt/ β -catenina

Los genes diana de la ruta Wnt/ β -catenina (como *TCF7*, *LEF1* y *MYC*) han sido relacionados en numerosos estudios con la generación y mantenimiento de las células T memoria (Driessens et al., 2011; Gattinoni et al., 2009). Las rutas PI3K/Akt y Wnt se interconectan a través de GSK3B (enzima glucógeno sintasa quinasa 3B). Akt fosforila e inactiva a GSK3B, lo que resulta en la translocación de la β -catenina al núcleo. Sin embargo, una activación constitutiva de Akt conlleva a la inhibición de los efectores de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina, que podría estar mediada por la pérdida de la actividad de FOXO1 (Kim et al., 2012; Ouyang et al., 2012).

1.2.2.3. NF- κ B

La ruta de señalización NF- κ B tiene un papel fundamental durante el desarrollo de las células T, pero también en su supervivencia (Gerondakis et al., 2014). En un estado quiescente, la familia de factores de transcripción NF- κ B permanece en el citoplasma unida al inhibidor κ B

(I κ B). Tras la activación de la célula T, Akt interviene en la relocalización de NF- κ B al núcleo, donde NF- κ B se une al promotor de determinados genes sensibles a Akt como *TNF α* o *IL-6*, aumentando su expresión (Cheng et al., 2011).

1.2.2.4. JAK/STAT

La unión de las citoquinas IL-15 e IL-7 a sus receptores activa tanto a la ruta JAK/STAT5 como PI3K/Akt, lo que resulta en el incremento de la expresión de genes anti-apoptóticos y, por tanto, de la supervivencia de las células T. No obstante, la activación de Akt de manera constitutiva parece inhibir la expresión de IL-7R así como IL-2R β , inhibiendo la señalización de STAT5 y la formación de células T memoria (Hand et al., 2010). Al contrario, la activación constitutiva de STAT5 ha sido relacionada con un aumento de la supervivencia de las células T efectoras y la formación de células T memoria (Grange et al., 2012).

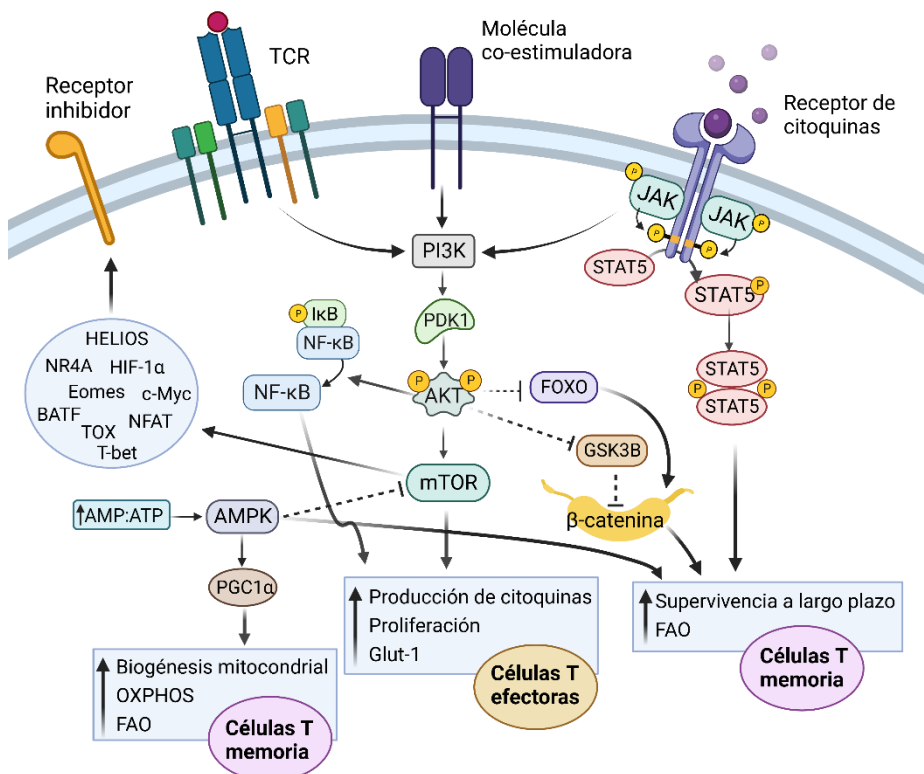


Figura 3. Esquema de las principales rutas de señalización que regulan el metabolismo de las células T. En respuesta a activación mediada por el TCR, las moléculas de co-estimulación y las citoquinas se activa la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, que induce la expresión del transportador de glucosa-1 (Glut-1), la proliferación de células T y la producción de citoquinas. La activación de mTOR conduce a la expresión de factores de transcripción que regulan la expresión de receptores inhibidores, como PD1. Un ratio AMP:ATP elevado activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que a su vez inhibe la actividad de mTOR, y al igual que las rutas β -catenina y JAK/STAT5 aumenta la oxidación de ácidos grasos (FAO), lo que mantiene la supervivencia de las células T a largo plazo y la formación de células T de memoria. AMPK también influye en la homeostasis mitocondrial promoviendo el recambio mitocondrial a través del factor de transcripción PGC1 α . *Figura creada con BioRender.com.*

1.2.3. Adaptación del metabolismo a la función de las células T

El estado celular metabólico va estrechamente ligado al estado de diferenciación de la célula T, puesto que los requerimientos bioenergéticos de las células T_{EF} son diferentes a los de las células T_M, usando, por tanto, diferentes vías metabólicas (Sukumar et al., 2017). Las células T_N se encuentran en un estado quiescente, con una demanda metabólica baja sustentada por la respiración mitocondrial (Cho et al., 1999). Tal y como se ha expuesto anteriormente, tras el reconocimiento del antígeno, las células T_N son activadas y proliferan rápidamente adquiriendo funciones efectoras para controlar el patógeno o tumor. Este proceso requiere un incremento en la captación de nutrientes, del metabolismo anabólico, así como la reprogramación del metabolismo mitocondrial (Gudmundsdottir et al., 1999). Tras la eliminación del antígeno, la mayoría de las células T_{EF} específicas para el antígeno mueren y una pequeña población de células T_M persisten (Kaech et al., 2002). Las células T_M revierten a un estado quiescente dependiente de la actividad mitocondrial principalmente, generando energía para mantener su auto-renovación (Buck et al., 2015) (**Figura 4**).

1.2.3.1. Metabolismo de células T *naïve*

Las células T_N pueden permanecer en el cuerpo humano toda una vida dado que mantienen un estado de quiescencia celular y metabólica. Este estado de quiescencia está mediado por la señalización de citoquinas homeostáticas como IL-7 y TGF β , la señalización tónica del TCR y el

metabolito esfingosina-1-fosfato (S1P). La unión de IL-7 a su receptor (IL-7R) promueve la supervivencia celular disminuyendo los niveles de proteínas pro-apoptóticas, incrementado la expresión de genes anti-apoptóticos o incrementando la entrada de glucosa a través del transportador de glucosa 1 (Rathmell et al., 2001). TGF β desempeña un papel dual en la homeostasis de las células T al promover la expansión promovida por IL-7, pero inhibiendo la expansión mediada por el TCR (Oh & Li, 2013). S1P inhibe la mitofagia en las células T *naïve* para mantener su masa mitocondrial y la OXPHOS (Mendoza et al., 2017). Las células T_N van a usar la glucosa principalmente para generar ácidos grasos, de los cuales obtendrán energía por medio de la beta-oxidación.

1.2.3.2. Metabolismo de las células T efectoras

Las células T_{EF} liberan citoquinas efectoras y citotóxicas, como IFN γ , TNF, granzima β o perforina y se expanden clonalmente para eliminar los antígenos extraños. Para mantener esta actividad, las células T_E aumentan la captación de glucosa para realizar la glucólisis y generar piruvato. Este es transformado mayoritariamente a lactato, lo que se conoce como efecto Warburg o glucólisis aerobia (ruta común con las células tumorales (Gubser et al., 2013)). El hecho de que las células T_{EF} usen mayoritariamente esta ineficiente vía para generar ATP parece estar relacionado con una rápida inducción de las enzimas involucradas y la generación de intermediarios para la biosíntesis celular (Pearce & Pearce, 2013). Las células T_{EF} también dependen del metabolismo de aminoácidos como la glutamina para proliferar (Carr et al., 2010). Estos cambios metabólicos que sufren las células T efectoras comprometen su calidad mitocondrial y su capacidad de auto-renovación (van der Windt et al., 2012).

1.2.3.3. Metabolismo de las células T memoria

Una pequeña fracción de células T va a sobrevivir al primer encuentro con el antígeno ya que adquieren un conjunto de adaptaciones metabólicas que permiten su auto-renovación y su larga duración (Blagih et al., 2015). En primer lugar, las células T_M van a remodelar su

morfología mitocondrial. En las células T_{EF} las mitocondrias son reclutadas al foco de la sinapsis inmunológica, produciéndose una ruptura de los sitios de contacto con el retículo endoplasmático, lo que se conoce como fisión. Este cambio morfológico otorga una alta capacidad para liberar calcio y ROS, pero altera las crestas mitocondriales dando lugar a un transporte electrónico deficiente (Buck et al., 2016). Mientras que las células T_M realizan la fusión mitocondrial, lo que genera menor cantidad de ROS y un estado óptimo de las crestas permitiendo que la cadena de transporte de electrones funcione adecuadamente y, por tanto, la respiración mitocondrial (Rambold et al., 2011). Esto explica que la capacidad respiratoria máxima (SRC) y la producción de ATP sean elevadas en las células T_M , así como la masa mitocondrial (van der Windt et al., 2013).

La SRC es el potencial oxidativo máximo de la mitocondria disponible para la producción de energía, y está vinculado con una mayor ventaja bioenergética en las células T en una nueva respuesta al antígeno y en condiciones de estrés metabólico (van der Windt et al., 2012). Estas características permiten a las células T_M una alta tasa de β -oxidación de ácidos grasos, la cual es clave para su desarrollo y mantenimiento (Pearce et al., 2009). Se ha visto que las células T memoria que sufren varios encuentros con el antígeno tienen mayor capacidad de persistencia y presentan mayor SRC y masa mitocondrial (Fraser et al., 2013).

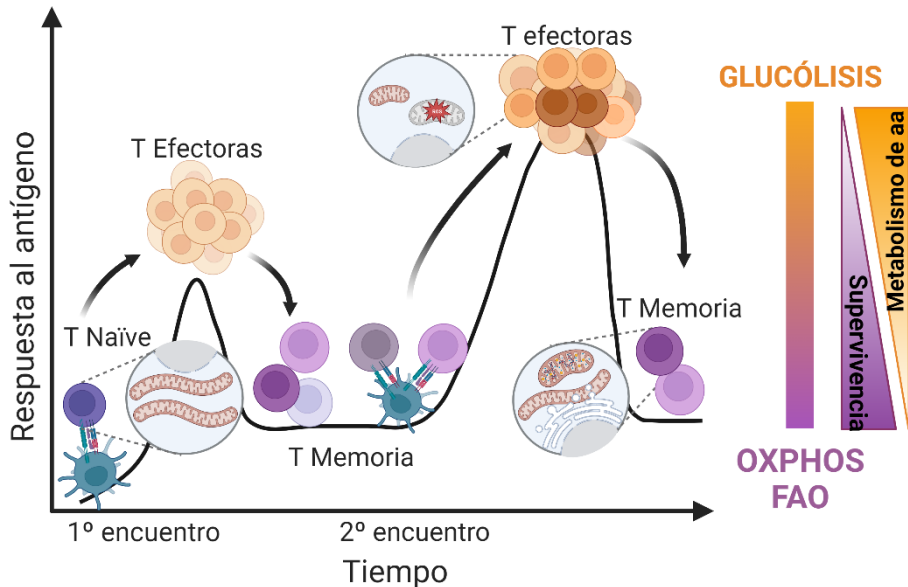


Figura 4. Esquema de los diferentes programas metabólicos entre células T naïve, memoria y efectoras. Las células T naïve descomponen la glucosa de manera eficiente a través del ciclo de ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para sobrevivir. También presentan una alta tasa de β -oxidación de ácidos grasos (FAO). Tras una exposición primaria al antígeno, las células T experimentan cambios proteicos y transcripcionales en el metabolismo que permiten la actividad sostenida de la glucólisis y la captación y el uso de otros aminoácidos, ambos necesarios para su proliferación y actividad citolítica. Después de eliminar el antígeno, muchas células T efectoras mueren. Sin embargo, una fracción de las células T sobreviven, las células T de memoria. Estas presentan una elevada biogénesis mitocondrial que permite mantener una alta tasa de OXPHOS y FAO. Estas células T memoria pueden sobrevivir durante muchos meses o años. Si estas células T memoria se vuelven a encontrar con el mismo antígeno, se convierten rápidamente en efectoras y utilizan de manera más eficiente la glucólisis y el metabolismo de aminoácidos para proliferar y secretar citoquinas de manera robusta. *Figura adaptada de Rangel Rivera y cols., 2021 y creada con Biorender.com.*

2. HERRAMIENTAS DE TERAPIA GÉNICA PARA INMUNOTERAPIA

La terapia génica es una disciplina que se emplea para corregir defectos genéticos o transferir nuevas funciones terapéuticas a las células diana. Las diferentes estrategias de terapia génica se pueden clasificar en: 1) adición génica (AG), que consiste en la modificación genética de las células diana para que expresen el gen o genes de interés (GOI) (**Figura 5**). 2) Edición genómica (EG), basada en la modificación del propio genoma de las células diana (**Figura 6**).

2.1. Adición génica (AG)

2.1.1. Métodos virales

Los principales vectores virales usados en terapia génica son vectores γ -retrovirales (γ -RVs), que derivan del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o del virus de células madre murinas (MSCV); y los vectores lentivirales (VLs), que proceden del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Ambos integran su genoma en la célula huésped, lo que permite la expresión del gen de interés a largo plazo en las células infectadas y su progenie.

Los γ -retrovirus y lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae* y son ampliamente usados para la modificación de células T dada su habilidad para conseguir altas eficacias de transducción y una expresión estable en el tiempo del transgén (Bonini et al., 2011).

Los retrovirus consisten en partículas con envuelta lipídica que contienen dos copias de ARN sencillo y una retrotranscriptasa, la cual retrotranscribe el ARN viral en ADN complementario (ADNc). La integración del ADNc del virus en el ADN del hospedador requiere de una integrasa, codificada por el genoma del virus, y de secuencias específicas en los LTRs (repeticiones terminales largas). La región U3 del LTR 5' contiene secuencias promotoras y potenciadoras que controlan la transcripción del genoma viral en el hospedador.

Para generar un vector sin capacidad replicativa, las secuencias virales son reemplazadas por el GOI. De manera que los genes necesarios para la generación de las partículas virales, como son *gag* (codifica para las proteínas de la cápsida), *pol* (codifica para las enzimas necesarias para la retrotranscripción y la integración) y *env* (codifica par la glicoproteína de la envuelta), son administrados en *trans* y divididos en diferentes plásmidos para evitar el riesgo de recombinación. En el caso de los vectores lentivirales se requiere además del gen *rev* para aumentar el exporte nuclear y de *tat* (solo en vectores de primera y segunda generación) para la expresión del vector en las células empaquetadoras. En todos los sistemas basados en retrovirus es fundamental que el

vector con el gen terapéutico incorpore la señal de empaquetamiento Psi (Ψ). Esta señal es utilizada por la proteína Gag para reconocer al ARN que tiene que incorporarse a la partícula viral.

De manera que para la generación de vectores retrovirales las células empaquetadoras se transfectan con 3 o 4 plásmidos (según la generación de los vectores):

1) Plásmido de la envuelta: expresa la proteína de la envuelta seleccionada. La proteína más utilizada para pseudotipar los VLS es VSV-G (la glicoproteína G de la envoltura fusogénica del virus de la estomatitis vesicular), la cual reconoce el receptor de lipoproteínas de baja densidad lo que hace que tenga un amplio tropismo por diferentes tipos celulares. En el caso de las células T, es necesario que sean previamente activadas para que expresen estos receptores y sean permisivas a la transducción (Amirache et al., 2014).

2) Plásmido/s de empaquetamiento: que contiene los genes necesarios para el empaquetamiento en un único plásmido, para los vectores de segunda generación, y en dos plásmidos, para la tercera generación.

3) Vector de interés: contiene el casete de expresión para el gen de interés, la señal de empaquetamiento (Ψ) y señales para la transcripción inversa e integración.

Los VLS, a diferencia de los γ -RVs, son capaces de transducir células no proliferativas (como células pluripotentes hematopoyéticas, las células dendríticas o las neuronas) gracias al transporte del complejo de pre-integración al interior del núcleo celular (Naldini et al., 1996). Además, mientras que los γ -RVs tienen preferencia de integración por sitios de inicio de transcripción (Cavazza et al., 2013), los lentivirus muestran una preferencia de inserción por las regiones transcripcionalmente activas (intrones, exones y regiones promotoras), sin preferencias claras, y por lo tanto, su riesgo de oncogénesis por inserción es más bajo (Montini et al., 2006).

Para incrementar la seguridad biológica de los mismos se han llevado a cabo varias estrategias:

1) Vectores auto-inactivables (SIN). Se han introducido deleciones en la región U3 del LTR 3' ($\Delta U3$), que tras la retrotranscripción también serán transferidas al LTR 5', inactivando así la transcripción viral en las células diana.

2) Promotores no virales. Además, en los VLs de tercera generación, el promotor U3 de la región LTR 5' ha sido reemplazado por promotores alternativos al viral, eliminando la necesidad de la proteína Tat para la generación de partículas virales en las células empaquetadoras.

3) Otras secuencias. Para impedir la transcripción de genes situados aguas abajo del vector, se han incorporado poliA más fuertes (Furger et al., 2001).

4) Elementos aisladores. A pesar de que el uso de los VLs para expresar un determinado transgén es uno de los sistemas más eficaces y estables, el casete de expresión puede silenciarse o variar la expresión durante la expansión y/o diferenciación. Una de las estrategias para evitar esto consiste en incluir elementos aisladores que funcionan como barreras contra los efectos represivos de la heterocromatina vecina, también previenen una activación inapropiada del promotor por activadores cercanos (Wei et al., 2005).

Todas estas mejoras en conjunto han hecho que en los últimos años los VLs se hayan convertido en los vectores de elección y, por tanto, que el número de ensayos clínicos y productos aprobados usando VLs sea cada vez más elevado (Labbe et al., 2021). Sin embargo, ambas herramientas han demostrado su seguridad y eficacia en miles de pacientes tratados desde el primer ensayo clínico usando células T modificadas en 1990 (Rosenberg et al., 1990). No se ha observado transformación de células T incluso en casos de inserción de un vector gamma-retroviral en el proto-oncogén *CBL* (Shah, Qin, et al., 2019), ni por destrucción de un gen supresor de tumor como *TET2* por integración de un vector lentiviral en pacientes tratados con células CAR-T (Fraietta, Nobles, et al., 2018). Únicamente, se reportó una expansión descontrolada de un único clon de células CAR-T que condujo a una respuesta antitumoral completa. En el supuesto caso de que este clon generara una neoplasia de células T,

podría ser rápidamente abordada al ser una población monoclonal. Estos casos han abierto un amplio campo de investigación de los genes sobreexpresados o eliminados tras la inserción del vector en productos que han presentado eficacia clínica.

El principal inconveniente de los sistemas virales es el coste asociado a su producción a nivel clínico GMP (buenas prácticas de fabricación). Esto ha llevado a la búsqueda de otros métodos de transferencia genética.

2.1.2. Sistemas libres de virus

2.1.2.1. Sistemas basados en transposones

Los transposones de ADN son elementos genéticos con la habilidad de cambiar su posición en el genoma a través de un mecanismo de corta-pega. Estos elementos contienen un gen flanqueado por repeticiones invertidas terminales (TIRs) que portan sitios de unión para la transposasa. Los sistemas de vectores basados en transposones consisten en dos componentes: por un lado, la transposasa (en forma de plásmido, ARNm o proteína recombinante) y por otro, el gen de interés (GOI) flanqueado de los TIRs (en forma de plásmido o minicírculo). En el proceso de transposición, la enzima transposasa media la escisión del transposón TIR-GOI-TIR del plásmido y su integración en el genoma de la célula diana. Por lo tanto, los vectores basados en transposones permiten la integración y expresión del ADN de interés en el genoma del hospedador de manera constitutiva. Los sistemas más conocidos y usados para la ingeniería de células humanas son *Sleeping Beauty* (SB) and *piggyBac* (PB).

Comparado con los sistemas retrovirales, el límite en el tamaño de ADN a entregar no está tan definido, aunque por encima de las 10-14 kilobases (kb) la eficacia se reduce substancialmente. Además, algunos autores argumentan que los transposones presentan un perfil más seguro que los vectores retrovirales y un coste inferior (revisado en (Amberger & Ivics, 2020)). Sin embargo, la mayor seguridad no está demostrada empíricamente y probablemente no sea extensible a todos

los tipos celulares. De hecho, la primera transformación de células T ha venido de la mano de *piggyBac* (Bishop et al., 2021), a pesar de las numerosas modificaciones genéticas realizadas con vectores retrovirales en este tipo celular.

2.1.2.2. ARNm y otros sistemas

Existen casos en los que no se desea una expresión continua de la proteína de interés en las células T, como cuando la proteína genera una alta toxicidad, como es el caso de IL-12 o IFN γ , o cuando el TCR o el CAR van dirigidos a proteínas que también se expresan en células sanas (toxicidad *on-target off-tumor*). En estos casos, la transfección de ARNm mediante electroporación en las células T permite una expresión transiente de la proteína codificada (Zhao et al., 2010).

Otra alternativa potencial a los vectores integrativos que se encuentra bajo investigación preclínica son los minicírculos de ADN, como el nano-S/MARt (nS/MARt) (Bozza et al., 2021).






		ADICIÓN GÉNICA				
		Vectores virales		Vectores no virales		
		Retrovirus	Lentivirus	Transposones	ARN	ADN episomal
						
Método de transferencia		Transducción		Electroporación		
Eficiencia		Alta	Alta	Moderada	Alta	Moderada
Integración		Sí, preferencia por sitios de inicio de transcripción	Sí, preferencia por regiones activas	Sí, random	No	No
Carga		<9 kb	<9 kb	>9 kb	-	-
Estabilidad de la modificación		Alta	Alta	Alta	Transiente (<10 días)	Estable/transiente
Coste		Alto	Alto	Moderado	Moderado	Bajo

Figura 5. Resumen de las principales estrategias para la modificación génica de células T.

2.2. Edición genómica (EG)

El rápido desarrollo de los sistemas de edición genómica (EG) basados en endonucleasas ha permitido la introducción de modificaciones

secuencia-específicas en un amplio rango de células. Las endonucleasas más usadas en el campo de las células T son meganucleasas, las nucleasas dedo de zinc (ZFNs), nucleasas de actividad similar al activador de transcripción (TALENs), y nucleasa 9 asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas9). Todas ellas utilizan el mismo principio: el uso de los mecanismos de reparación de la propia célula para introducir los cambios deseados.

EDICIÓN GENÓMICA				
Endonucleasas específicas				
	Meganucleasas	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
Método de transferencia	Electroporación, vectores virales, liposomas, nanopartículas			
Eficiencia	Alta	Alta	Alta	Alta
Frecuencia <i>off-targets</i>	Poco frecuente	Baja	Baja	Moderada
Diseño	Muy laborioso	Laborioso	Moderado	Simple
Cargo (NHEJ)	1 kb x 2	1 kb x 2	3 kb x 2	4,2 kb (Cas9) + 0,1 kb (ARNg)
Versatilidad	Baja	Alta	Alta	Muy alta
Coste	Elevado	Elevado	Medio	Bajo

Figura 6. Características generales de las principales endonucleasas específicas usadas en edición genómica. Meganucleasas, contienen un dominio de reconocimiento del ADN y otro de corte, para que este se produzca deben de formar dímeros. Nucleasas dedo de zinc (ZFNs), para el corte se requiere la dimerización de dos nucleasas FokI. Cada dedo de zinc interacciona con tres nucleótidos de la secuencia diana. Nucleasas de actividad similar al activador de transcripción (TALENs), el corte es mediado por dos FokI, cada una unida a un TALE, el cual contiene 34 secuencias repetidas de aminoácidos. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)/nucleasa 9 asociada (Cas9), consiste en un ARN que guía a la nucleasa Cas9 para cortar el ADN diana. El sitio diana está flanqueado por una secuencia PAM (motivo adyacente de protoespaciador), y el corte tiene lugar 3 pares de bases (pb) aguas arriba del PAM.

2.2.1. Mecanismos de reparación

La introducción de roturas de ADN de doble cadena (DSBs) desencadena diversos mecanismos de reparación (**Figura 7**). El mecanismo más usado se conoce como unión de extremos no homólogos (NHEJ), el cual actúa

rápidamente uniendo los dos extremos y en el que participa una polimerasa propensa a error (Pol μ o Pol λ), por lo que suele introducir pequeñas inserciones y/o deleciones (*indels*), de menos de 20 pb. Esto resulta en la interrupción del gen (estrategia *knock out*, KO) si la mutación se localiza en la región codificante. Otro mecanismo de reparación es la recombinación homóloga (HR) el cual es menos eficiente ya que tiene lugar principalmente durante las fases S y G2, pero más preciso y requiere de un ADN molde. Este ADN molde puede ser un ADN donador con brazos de homología. Dependiendo de la secuencia del ADN donador, se puede corregir la mutación o introducir una nueva secuencia en el sitio de corte (estrategia *knock in*, KI).

Otros mecanismos de reparación son la unión de extremos alternativa (alt-EJ), también conocido como unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), y el alineamiento de hebra única (SSA). Ambos mecanismos están mediados por un proceso de alineamiento de secuencias con (micro)homologías reveladas tras la resección de los extremos. En los procesos de alt-EJ, la polimerasa Pol θ estabiliza el alineamiento de las microhomologías (que pueden ir de 2-10 pb) y extiende la secuencia de ADN utilizando la otra hebra como plantilla. El resultado es la eliminación de la región del ADN situada entre ambas microhomologías, produciendo una deleción de tamaño variable. Pol θ es una polimerasa muy propensa a errores, a veces introduciendo hasta 10 inserciones asociadas a la microhomología, lo que podría originar nuevas regiones de microhomología (Yu & McVey, 2010). Para que tenga lugar SSA, las homologías deben ser mayores de 20 pb, por lo que la región de ADN situado entre las secuencias repetidas suele ser mayor, pudiendo generar grandes deleciones (Ceccaldi et al., 2016).

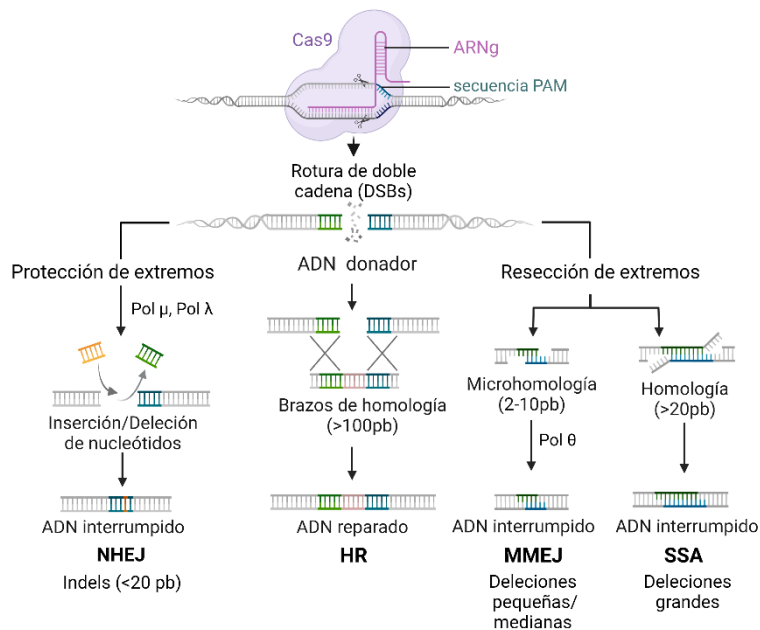


Figura 7. Descripción general de las diferentes vías de reparación del ADN en la célula. Los DSBs generados por endonucleasas específicas (en este caso CRISPR/Cas9) pueden ser reparados por diferentes mecanismos. La resección del extremo del ADN es la primera y más importante característica que definirá el uso de una u otra vía. Cuando hay poca o ninguna resección final, el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ) repara el DSB. La reparación está mediada por polimerasas propensas a errores (Pol λ , Pol μ), generando inserciones y/o delecciones (*indels*) de pequeño tamaño (<20 pb), interrumpiendo el gen. Si junto con el corte entregamos un ADN donador con brazos de homología con la región diana tiene lugar el mecanismo de recombinación homóloga (HR), reparando de forma precisa el DSB. Esta propiedad se puede usar para corregir una mutación o introducir una nueva secuencia. Cuando se produce alguna resección terminal y se ponen de manifiesto microhomologías (2-10 pb), el ADN es reparado por alt-EJ/MMEJ, que usa la Pol θ , generando delecciones de pequeño y mediano tamaño. Si la resección es más extensa y se ponen de manifiesto homología (>20 pb) se promueve la vía SSA, generando delecciones de gran tamaño. NHEJ: unión de extremos no homólogos, alt-EJ: unión de extremos alternativa, MMEJ: unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), SSA: alineamiento de hebra única, HR: recombinación homóloga. *Figura creada con BioRender.com.*

2.2.2. Sistema CRISPR/Cas9: ventajas y desventajas

Entre los sistemas de EG disponibles, para el desarrollo de esta tesis nos hemos centrado en la tecnología CRISPR/Cas9.

El sistema CRISPR/Cas9, desarrollado en 2012 a partir del sistema inmunitario adaptativo de la bacteria *S. pyogenes*, fue la primera

herramienta de EG basada en los sistemas CRISPR y en usar ARN para dirigir a la nucleasa al sitio diana. CRISPR es una familia de secuencias de ADN que se encuentran en los genomas de organismos procarióticos como bacterias y arqueas. Estas secuencias derivan de fragmentos de ADN de bacteriófagos que habían infectado previamente al organismo. La colección de estos fragmentos permite a los organismos procarionotas detectar y destruir el ADN de bacteriófagos similares en infecciones posteriores.

El equipo de J. Doudna y E. Charpentier demostró que el sistema CRISPR/Cas9 natural se puede rediseñar para dirigirse a cualquier secuencia de ADN con el único requisito de tener una secuencia PAM (motivo adyacente de protoespaciador), que en el caso de *S. pyogenes* consiste en un XGG (donde X puede ser cualquier nucleótido). Aunque el sistema original usa dos moléculas de ARN, una secuencia de ARNcr que es específica para el ADN diana y una secuencia de ARNtracr que interactúa con la proteína efectora Cas9, los autores demostraron que este sistema también funcionaba usando una guía única de ARN (ARNsg). Los complejos ARNcr:ARNtracr:Cas9 o ARNsg:Cas9 generan la rotura del ADN diana entre 3-4 pares de bases aguas arriba de la secuencia PAM (Jinek et al., 2012).

Hoy en día, existen una gran variedad de variantes de Cas9. En los primeros ensayos de edición de células T con CRISPR/Cas9, el sistema era entregado en forma de plásmido o de vectores virales. Estos métodos han sido sustituidos por el sistema de ribonucleoproteína (RNP) entregado por electroporación, el cual presenta una alta eficiencia y menor toxicidad (Seki & Rutz, 2018). El ARNg puede inducir la activación de interferón tipo I, para evitarlo se han introducido diferentes modificaciones en los extremos del mismo (Kim et al., 2018).

El sistema CRISPR/Cas9 es una tecnología ampliamente utilizada en la ingeniería de linfocitos T. En comparación con el resto de herramientas de edición genética, el sistema CRISPR/Cas9 presenta importantes ventajas, entre ellas su sencillez, reducido coste (ya que no requiere un nuevo conjunto de nucleasas para cada diana), alta especificidad, versatilidad y efectividad (revisado en (Katti et al., 2022)).

La principal preocupación del uso de CRISPR/Cas9 es el riesgo de genotoxicidad, principalmente derivado de la posibilidad de introducir cortes fuera de diana (*off-targets*). En este sentido, las compañías están realizando un gran esfuerzo por desarrollar variantes de Cas9 con alta fidelidad. Además, los métodos para la detección y predicción de *off-targets* cada vez son más implementados y más sensibles como son GUIDE-Seq, Digenome-Seq, BLISS, CIRCLE-seq, LAM PCR HTGTS o DISCOVER-Seq (revisado en (Atkins et al., 2021; Martin et al., 2016). El riesgo de *off-targets* también se puede reducir utilizando dímeros de Cas9 que requieren la expresión simultánea de dos ARNg.

La tecnología CRISPR/Cas9 también permite una edición múltiple del genoma con una buena eficiencia (Minkenberg et al., 2017). Aunque esto aumenta la probabilidad de que se produzcan translocaciones (Liu et al., 2021) o incluso aneuploidía (Nahmad et al., 2022). Hasta el momento no se ha descrito ningún caso que relacione estas aberraciones del cromosoma con eventos de transformación. También se ha detectado la presencia de largas deleciones en el sitio de corte de CRISPR/Cas9, de cientos de pares de bases a kilobases (Kosicki et al., 2018). Desde su detección y descripción por primera vez por Kosicki y cols., múltiples estudios han descrito la presencia de estas largas deleciones usando diferentes métodos, desde técnicas basadas en PCR a secuenciaciones masivas, en distintos tipos celulares (Kosicki et al., 2018; Liu et al., 2021; H. Ma et al., 2017; Mianne et al., 2017; Shin et al., 2017; Wen et al., 2021), incluso células T primarias (Maldonado-Perez et al., 2022; Wen et al., 2021; Wu et al., 2022). Varios estudios han reportado la presencia de microhomologías en los sitios de ruptura de las largas deleciones (Liu et al., 2021; Owens et al., 2019), sugiriendo que NHEJ, MMEJ y SSA están involucrados en su generación. Sin embargo, pueden intervenir otros factores, por lo que estos eventos son solo parcialmente dependientes de la secuencia (Owens et al., 2019).

3. TERAPIA CELULAR ADOPTIVA (TCA)

En las últimas décadas, se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de estrategias para potenciar el sistema inmunológico contra el cáncer. El uso de anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes dirigidas

a moléculas tumorales y a los puntos de control inmunitario (como son los receptores inhibidores) constituye uno de los principales pilares en inmunoterapia. Estas terapias basadas en pequeñas moléculas han mejorado la supervivencia de pacientes con tumores avanzados, como melanoma metastásico, cáncer de pulmón o carcinoma renal. No obstante, una alta proporción de pacientes no responden a estos tratamientos (15-60%) (Das & Johnson, 2019). Esto unido a la gran evolución en la comprensión de la biología de los sistemas celulares ha impulsado el uso de células humanas como entidades terapéuticas. A diferencia de las moléculas biológicas, las células son sistemas vivos capaces de percibir e integrar señales y ejecutar respuestas complejas.

La terapia celular adoptiva (TCA) consiste en la utilización de células inmuno-competentes del paciente o de un individuo sano, su expansión y/o modificación genética para incrementar su actividad u otorgarles otra nueva función, y, finalmente, su re-inoculación en el paciente. En el campo de la oncología, la transferencia adoptiva de células T en ratones ayudó a establecer las bases de la inmunidad antitumoral (Greenberg, 1991). Estos estudios revelaron la capacidad de las células T alogénicas para erradicar tumores, a través del efecto injerto contra tumor (EICT), el cual se considera un beneficio colateral de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Weiden et al., 1979). Estas investigaciones señalaron la necesidad de controlar la composición de los productos celulares terapéuticos.

3.1. Terapia adoptiva con células T

Las células T se han convertido en las elegidas para muchas estrategias de inmunoterapia dada su facilidad de obtención, expansión y re-infusión, compatibles con una práctica de grado clínico. Otras características que hacen a esta terapia idónea para el tratamiento antitumoral son: 1) Las respuestas de células T son específicas; 2) Las respuestas de las células T son robustas, sufren hasta 1000 veces la expansión clonal tras su activación; 3) Las células T pueden viajar hasta el sitio de presentación del antígeno; y 4) Las respuestas de células T

generan células memoria, permitiendo así mantener el efecto terapéutico a largo plazo (Perica et al., 2015).

Entre las estrategias más prometedoras de terapia celular adoptiva basada en células T se encuentran la terapia con linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) (Dafni et al., 2019); las células T $\gamma\delta$ (Saura-Esteller et al., 2022); las células T virus específicas, a partir de las cuales se ha generado el primer producto con células T alogénicas aprobado en el mercado recientemente (Ebvallo) (Prockop et al., 2021); y, por supuesto, las células T modificadas genéticamente para expresar un TCR específico o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Además de las células T, otros tipos celulares utilizados en terapia celular adoptiva para el tratamiento antitumoral son las NKs, células madre, macrófagos o células dendríticas.

4. INGENIERÍA DE CÉLULAS T: CÉLULAS T-TCR TRANSGÉNICAS Y CÉLULAS CAR-T

El desarrollo de nuevas tecnologías en el campo de la terapia génica, como son los vectores virales no replicativos o las nucleasas dirigidas, abrió la puerta a múltiples posibilidades en el campo de las terapias celulares. En concreto, la inmunoterapia génica ha hecho grandes esfuerzos en la ingeniería de linfocitos T con la finalidad de dirigir específicamente a las células citotóxicas hacia el tumor e incrementar su eficacia y seguridad.

4.1. TILs de nueva generación

Las herramientas de terapia génica también se han utilizado sobre los TILs para incrementar su supervivencia *in vivo*, por ejemplo sobreexpresando IL-12 (Zhang et al., 2015) o eliminando la expresión de PD1 (Chamberlain et al., 2022) o del factor de transcripción Gata-3, relacionado con disfunción de las células T (Singer et al., 2016).

4.2. Células T TCR transgénicas

La dificultad para el aislamiento y expansión de células T expresando TCR específicos para antígenos asociados a tumor (TAAs) juntos con los avances en ingeniería genética impulsó la generación de células T ingenierizadas para expresar TCR tumor-específicos. Lo ideal sería que estos TCRs fueran dirigidos a antígenos específicos de tumor (TSA), como son los neoantígenos (Deniger et al., 2016), pero los costes asociados a una terapia individualizada impiden su aplicación a gran escala. Debido a esto lo más habitual es dirigirlos a antígenos sobreexpresados en las células malignas o que son restringidos a un linaje, aunque esto conlleva a una toxicidad *on-target off-tumor* (toxicidad en diana, fuera del tumor) (Johnson et al., 2009). Por ejemplo, los antígenos MAGE, NY-ESO-1, PRAME y SSX, expresados solo por células malignas y células germinales masculinas, han sido muy explotados en esta estrategia. A pesar de la tasa de respuesta favorable, en la mayoría de los pacientes no se produce una erradicación completa del tumor (Robbins et al., 2015). Para mejorar esto se están llevando a cabo diferentes estrategias para incrementar los niveles de expresión y aumentar la afinidad, manteniendo una reactividad cruzada reducida (Thomas et al., 2019). Además, la combinación con inhibidores de puntos de control o con estrategias de edición génica para aumentar la potencia de la terapia celular está siendo investigada en diferentes ensayos clínicos (NCT03399448, NCT02775292, NCT03709706). La eliminación del TCR endógeno -el cual limita la eficacia del TCR transgénico dada la competición por CD3 y la formación de heterodímeros- junto con PD1, ha sido estudiada por primera vez en un ensayo clínico con células T-TCR autólogas. Las células T doblemente editadas resistieron hasta 9 meses en los pacientes, aunque solo uno de los tres pacientes tratados experimentó regresión del tumor (Stadtmauer et al., 2020).

4.3. Células CAR-T

Las células CAR-T son células T que han sido modificadas para expresar en su superficie un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CARs son receptores ingenierizados para redirigir y otorgar propiedades específicas a una célula efectora del sistema inmunológico. El CAR normalmente consiste en un motivo extracelular que reconoce específicamente el antígeno unido a través de una región transmembrana a uno o varios dominios de activación y señalización intracelulares de células T. A diferencia de los TILs o de las células T TCR específicas, las células CAR-T reconocen el antígeno de una manera independiente a MHC, por lo cual esta terapia es insensible a los mecanismos de escape por parte del tumor relacionados con la pérdida de variantes del MHC (Zhou & Levitsky, 2012). Aunque recientemente se ha demostrado que los CARs tienen una sensibilidad por el antígeno menor que los TCRs. En concreto, los CARs necesitan 100 veces más moléculas de antígeno para activar correctamente a las células T como consecuencia de un uso ineficiente de los receptores accesorios (Burton et al., 2023).

4.3.1. Estructura y biología

El primer concepto de CAR fue desarrollado por los inmunólogos israelíes G. Gross y Z. Eshhar a finales de la década de los 80 (Gross et al., 1989) y consistía en la región variable de la cadena pesada unida a la región constante. En los siguientes 30 años, la arquitectura de los CARs ha evolucionado considerablemente (**Tabla 1**).

La primera generación de CAR constaba de un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo y el dominio intracelular de la cadena CD3 ζ del TCR o el dominio intracelular de Fc ϵ R1 γ (cadena gamma del receptor de la región Fc de la IgE). Sin embargo, esta primera generación mostró una expansión y eficacia antitumoral limitadas debido a la falta de señalización mediada por moléculas co-estimuladoras (señal 2) y por citoquinas, como IL-2 (señal 3), lo que podía conducir a un estado de anergia (Savoldo et al., 2011).

Fisiológicamente la activación de la célula T depende de la interacción con la célula presentadora de antígenos a través del TCR pero también de moléculas co-estimuladoras. De manera que para mejorar tanto la capacidad de expansión como la actividad antitumoral, se añadió uno o dos dominios co-estimuladores, como CD28, CD137 (4-1BB), CD27, OX40 o ICOS, dando lugar a la segunda y tercera generación de CAR, respectivamente.

La unión del scFv a su diana desencadena la activación de los dominios intracelulares y con ello todas las funciones que dichos dominios desempeñan: la actividad citotóxica de la célula T, secreción de citoquinas proinflamatorias, expresión de genes de supervivencia, etc (**Figura 8**).

El dominio extracelular determina la especificidad del CAR que se ve afectada por la afinidad del scFv, la topología espacial del epítipo, la flexibilidad del CAR (determinada por la región de unión o bisagra entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana) o los niveles de expresión del antígeno (Hombach et al., 2010; Hudecek et al., 2013). Los dominios de unión al antígeno de alta afinidad evitan que las células cancerosas con bajos niveles de antígeno escapen del tumor (Liu et al., 2015). En el caso de los CARs anti-CD19, la mayoría presentan el epítipo FCM63, el cual presenta alta afinidad. Sin embargo, Ghorashian y cols., demostraron que el uso de un CAR anti-CD19 de baja afinidad podría conferir una mayor citotoxicidad y proliferación con menor toxicidad (Ghorashian et al., 2019). En tumores sólidos, una afinidad moderada ha sido relacionada con una mejor respuesta clínica (Mao et al., 2022). Aparte del fragmento scFv, también pueden usarse como dominio de unión al antígeno un ligando o receptor.

El dominio bisagra también participa en el transporte eficiente del CAR a la membrana y en el umbral de señalización. Por ejemplo, en un CAR anti-VEGFR2 se observó que a mayor longitud del dominio bisagra, mayor nivel de expresión del CAR. El dominio transmembrana (TM) participa en el nivel y estabilidad de expresión del CAR (Fujiwara et al.,

2020). Los dominios bisagra y TM hasta ahora usados derivan de CD28, CD8, CD4 o CD3z.

Los dominios intracelulares son cruciales en la actividad de las células CAR-T pues son los encargados de la transducción de señales. El dominio CD28 ha sido relacionado con una mayor capacidad citotóxica, lo que conlleva también a un agotamiento temprano de las células T. Mientras, el dominio 4-1BB se ha asociado con una mayor persistencia a largo plazo (Kawalekar et al., 2016). No obstante, poniendo en conjunto los estudios realizados hasta ahora no se ha podido determinar cuál otorga superioridad en la actividad antitumoral (Cappell & Kochenderfer, 2021). En varios estudios se ha demostrado que los CARs de tercera generación, en comparación con los de segunda, aportan una mayor persistencia y una mejor función efectora (Roselli et al., 2021; Tammana et al., 2010; Zhang et al., 2022). No obstante, la mayoría de los investigadores utilizan CARs de segunda generación por criterios de eficacia/seguridad, sobre todo en cánceres hematológicos (Han et al., 2013). Por lo tanto, no existe una estructura definitiva y efectiva bajo cualquier circunstancia, lo ideal sería analizar todos los parámetros del tumor y elegir el CAR que mejor se ajuste a cada caso.

La co-expresión de citoquinas u otras moléculas activadoras ha dado lugar al desarrollo de los CARs de cuarta generación (TRUCKs) (Makita et al., 2017). La posibilidad de expresar cualquier producto transgénico de manera constitutiva o inducible (normalmente a través de un casete de expresión regulado por NFAT) en el tejido diana ha convertido a los TRUCKs en la estrategia principal para luchar contra el microambiente tumoral generado por los tumores sólidos (Chmielewski & Abken, 2015). Gran parte de los estudios con TRUCKs se han centrado en la co-expresión de citoquinas como IL-12, IL-15, IL-7 o IL-18, las cuales incrementan la actividad antitumoral y/o persistencia de las células CAR-T. Los prometedores resultados obtenidos en modelos preclínicos usando los TRUCKs, ha llevado a su uso en varios ensayos clínicos: NCT03542799, NCT03932565 o NCT04684563.

Otras moléculas interesantes para co-expresar con el CAR son anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos tumorales o a los receptores inhibidores. Esta estrategia está siendo evaluada en un ensayo clínico para el tratamiento de tumores sólidos avanzados con células CAR-T α -EGFR que tras su activación liberan anticuerpos frente a CTL1-4 y PD1 (NCT03182816).

Las nuevas generaciones de CARs están trabajando en mejorar la persistencia de las células CAR-T y minimizar la toxicidad *off-target off-tumor* (fuera de diana, fuera del tumor).

Por ejemplo, se ha desarrollado un CAR que contiene un dominio de activación de las rutas JAK/STAT, involucradas en la vía de señalización de citoquinas (Kagoya et al., 2018). Otros nuevos desarrollos han dado lugar a lo que se denomina las células CAR-T inteligentes. Estas incluyen a las células SUPRA CAR, que consisten en un receptor universal y una molécula adaptadora que puede ser acoplada a diferentes scFvs. Este sistema permite cambiar la especificidad, regular la fuerza de activación de la célula T e integrar señales de múltiples antígenos (Cho et al., 2018). Otra nueva estrategia consiste en los receptores interruptores, que pueden ser de apagado (OFF, median la degradación del CAR a través de una droga) o de encendido (ON, activación dependiente de antígeno y una droga), un ejemplo son los CARs controlados por lenalidomida (Jan et al., 2021) o los SNIP CARs, regulados por una proteasa y un inhibidor de proteasas (grazoprevir) (Labanieh et al., 2022).

GENERACIÓN	CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS
PRIMERA	Un dominio de activación (CD3z)
SEGUNDA	Un dominio de activación y uno de co-estimulación (CD28, 4-1BB, ICOS...)
TERCERA	Un dominio de activación y dos de co-estimulación
CUARTA (TRUCKS)	Un dominio de activación y uno de co-estimulación, junto con la co-expresión de citoquinas (IL-12, IL-18, IL-7...) u otras moléculas
QUINTA	Un dominio de activación, uno de co-estimulación y un fragmento de un receptor con sitios de unión a FTs
OTROS DISEÑOS	SUPRA CARs; CARs multidiana; CARs programados endógenamente

Tabla 1. Descripción de las diferentes generaciones del CAR. FTs: factores de transcripción; SUPRA CARs: CARs ajustables y programables (del inglés *Split, universal y programmable*).

4.3.2. Producción de células CAR-T

En la inmensa mayoría de las estrategias de inmunoterapia con células CAR-T, las células T de sangre periférica del propio paciente, son aisladas, modificadas genéticamente con los genes del CAR y expandidas *ex vivo*. El nuevo producto es re-infundido en el paciente, tras una linfodepleción para favorecer el injerto de las células CAR-T y reducir el tamaño del tumor (Zhang et al., 2017). Se han usado una amplia variedad de métodos para introducir el CAR en las células T: métodos no integrativos, como la electroporación de ARNm o ADN episomal (Bozza et al., 2021; Svoboda et al., 2018; Zhang et al., 2018); e integrativos, basados en virus y transposones (**Figura 8**). Son estos últimos, y en particular los basados en vectores retrovirales (γ -retrovirales y lentivirales), los más utilizados en ensayos clínicos. Dentro de estos, los vectores lentivirales (VLs) son los más usados por su elevada eficiencia, estabilidad y seguridad biológica de los sistemas de última generación (Biffi et al., 2011).

El transposón *Sleeping Beauty* mostró una transferencia génica estable y eficiente en diferentes células, incluyendo las células T, pero el tiempo de cultivo necesario era muy prolongado (Singh et al., 2008). Recientemente, la mejora de estos inconvenientes ha dado lugar a los primeros ensayos clínicos utilizando estos sistemas no-virales para la generación de células CAR-T, que podrían potencialmente reducir el coste de producción (Kebriaei et al., 2016; Prommersberger et al., 2021). Sin embargo, hay que mencionar que en un ensayo clínico usando células CAR-T anti-CD19 modificadas con el transposón *piggyBac* (Ramanayake et al., 2015), dos pacientes desarrollaron un linfoma originado por las células CAR-T tras conseguir una respuesta completa (Bishop et al., 2021).

Por su parte, los ensayos clínicos usando el sistema SB han presentado eficacia terapéutica sin problemas de genotoxicidad y muchas

expectativas. Este es el caso del ensayo clínico CARAMBA (NCT04499339), el primer ensayo clínico con células CAR-T libres de virus en Europa usando una versión mejorada de SB (SB100X) (Prommersberger et al., 2021).

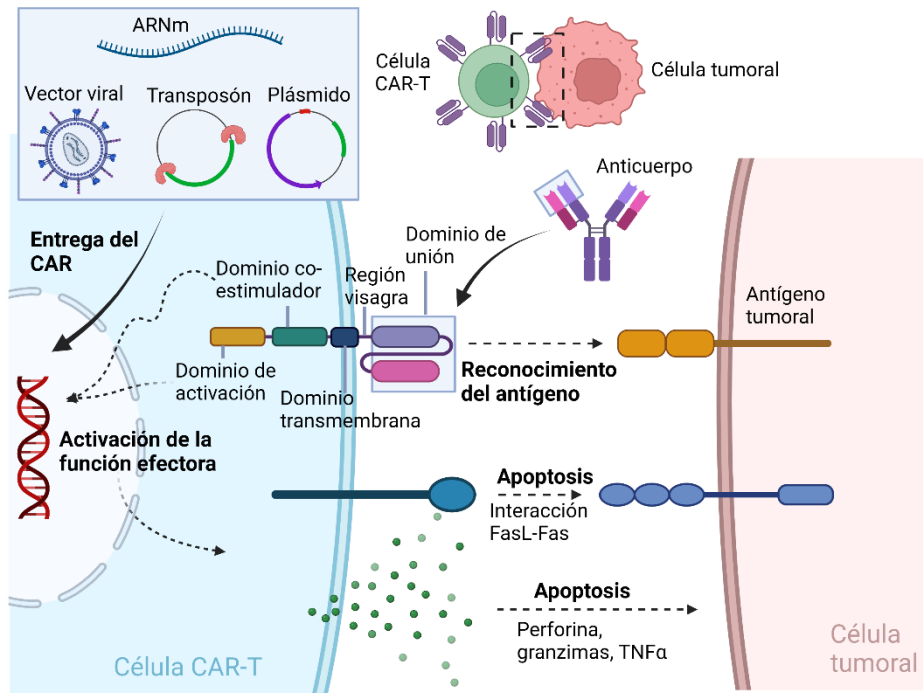


Figura 8. Modificación y mecanismo de acción de las células CAR-T. Esta figura representa como se ingenieriza una célula T para que exprese el CAR en su superficie. Para transferir el ADN que codifica el CAR en el núcleo de la célula se pueden usar vectores virales (retrovirus), transposones, plásmidos o directamente en forma de ARN. En concreto se representa un CAR de segunda generación con un único dominio de co-estimulación (4-1BB, CD28) y un dominio de activación (CD3z). Cuando el CAR reconoce el antígeno tumoral, la señal es amplificada y transferida al núcleo, donde se inicia una serie de respuestas citotóxicas. *Figura creada con BioRender.com.*

5. TERAPIA CAR-T: CÓMO MEJORAR SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y SEGURIDAD

No es coincidencia que las células CAR-T se hayan dirigido inicialmente al tratamiento de neoplasias hematológicas, dada la extensión de antígenos de superficie conocidos expresados únicamente en el linaje hematopoyético, así como la relativa facilidad de seguimiento del tumor

y la preferencia natural de los productos terapéuticos de concentrarse en los órganos hematológicos, como son la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos (Maus et al., 2014).

Dentro de las neoplasias hematológicas, encontramos las neoplasias linfoides, que afectan a la línea linfóide B y T. Clásicamente, se ha diferenciado entre leucemias, como aquellas que afectan a las células de la médula, y linfomas, como aquellos procesos localizados en los órganos linfoides periféricos. Asimismo, se ha distinguido entre leucemias agudas (células inmaduras) y crónicas (células más diferenciadas). La OMS (organización mundial de la salud) ha clasificado las neoplasias linfoides en tres grupos según el tipo celular involucrado: linfomas de Hodgkin, neoplasias de células T y NK, y neoplasias de células B (Harris et al., 1999).

El linfoma no Hodgkin (LNH) es la neoplasia más común, dentro de la cual las neoplasias de células B constituyen el 85%. Entre las leucemias de células B más frecuentes se encuentran la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que afecta sobre todo a niños, y la leucemia linfocítica crónica (LLC), la cual afecta principalmente a adultos. Afortunadamente, entre un 65-80% de los pacientes responden a los tratamientos quimio-inmunoterapéuticos, que consisten en la combinación de fármacos inhibidores de la proliferación (como ciclofosfamida) y de anticuerpos monoclonales (como rituximab, anticuerpo anti-CD20). A pesar de ello, el elevado porcentaje de pacientes que recaen pone de manifiesto la necesidad de alternativas, como son los inhibidores de la ruta de señalización del BCR (ibrutinib y idelalisib) (Byrd et al., 2013) o el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (Dreger et al., 2010). Sin embargo, las mejores eficiencias terapéuticas para el tratamiento de leucemias y linfomas refractarios han llegado de la mano de la terapia celular-génica y la generación de células T expresando CARs (Adami & Maher, 2021).

5.1. Éxitos de la terapia CAR-T: productos CAR-T comerciales

Aunque se han desarrollado cientos de células CAR-T frente a diferentes antígenos tumorales, los mejores resultados obtenidos han sido usando CAR-T dirigidas contra los antígenos CD19 y CD22, en leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) y linfoma de células B, y contra BCMA (antígeno de maduración de células B) en mieloma múltiple (MM). Esto explica que de los más de 1000 ensayos clínicos con células CAR-T, sobre el 75% se centren en neoplasias hematológicas.

Teniendo en cuenta que los pacientes involucrados en los ensayos clínicos con CAR-T son refractarios a 2-4 líneas de tratamiento (es decir, cuando ya no existen alternativas terapéuticas), los resultados han sido realmente espectaculares. En la LLA de células B la terapia CAR-T ha conseguido hasta un 80% de respuesta completa y una supervivencia libre de progresión (SLP) de un año del 50% (Maude et al., 2018; Pasquini et al., 2020). En el linfoma B difuso de células grandes (LBDCG) la supervivencia ha alcanzado el 40%, en el linfoma de células B del manto (LCM-B) un 61% y en el linfoma folicular (LF) un 74% (Abramson et al., 2020; Jacobson et al., 2020; Nastoupil et al., 2020). En el caso del MM el tiempo libre de progresión es de 8 meses (Munshi et al., 2021).

Actualmente existen 6 productos con células CAR-T aprobadas por la FDA (*USA Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*): Kymriah, Yescarta, Tecartus, Breyanzi, Abecma y Carvykti. Además, la NMPA China (*China's National Medical Products Administration*) ha aprobado Carteyva, y la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) el uso de ARI-0001 bajo exención hospitalaria en el Hospital Clínic de Barcelona (**Tabla 2**). La exención hospitalaria es un mecanismo que permite al centro que la ha solicitado específicamente ofrecer la terapia en cuestión, más allá de los ensayos clínicos y con unos datos más modestos que los que necesita un medicamento comercial para su aprobación.

ARI-0001 representa la primera terapia CAR-T española aprobada para uso hospitalario, la cual ha sido desarrollada con fondos públicos por el

Hospital Clínic, por lo tanto, se trata de un CAR académico. Esta terapia está indicada para LLA-B en pacientes mayores de 25 años, es decir, una población que queda fuera de la indicación de las CAR-T comerciales (Trias et al., 2022). ARI-0001 consiste en un CAR de segunda generación, basado en un scFv derivado de un nuevo anticuerpo monoclonal anti-CD19, A3B1, junto con los dominios CD8 (bisagra y dominio transmembrana), 4-1BB (dominio de co-estimulación) y CD3 ζ (dominio de activación). Tras la realización de ensayos preclínicos satisfactorios, usando vectores lentivirales y el biorreactor CliniMACS Prodigy (Castella et al., 2019), su seguridad y eficacia fue estudiada en un ensayo clínico (CART19-BE-01) con 47 pacientes con neoplasias tipo B (80% con R/R LLA-B), obteniendo respuestas similares a las de las terapias CAR-T comerciales (SLP de un año=47%) (Castella et al., 2020; Ortiz-Maldonado et al., 2021). ARI-0001 también ha demostrado ser seguro y efectivo en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (Ortiz-Maldonado et al., 2022). Actualmente, la terapia ARI-0001 está siendo investigada en un ensayo clínico de fase 2 (CART19-BE-02) y ha conseguido la designación PRiority MEDicine (PRIME) de la EMA.

Dada la eficacia de las terapias CAR-T en los diferentes grupos de pacientes refractarios a varias líneas de tratamiento, se está empezando a investigar la posibilidad de su utilización como primera línea en determinados tipos de cáncer. Recientemente un estudio ha comparado los resultados del ensayo clínico ELARA (Kymriah para linfoma folicular) con los de una cohorte con el mismo criterio de elegibilidad tratada convencionalmente, obteniendo una tasa de respuesta completa 1,9 veces mayor con el producto CAR-T, así como así como una reducción del riesgo de muerte del 80% (Salles et al., 2022).

NOMBRE	CÉLULAS/ ANTÍGENO/ VECTOR/DI	INDICA- CIÓN	ENSAYO CLÍNICO	BENEFICIO CLÍNICO (TR)	AÑO DE APROBA- CIÓN (AUTORI- -DAD)
---------------	---	-------------------------	---------------------------	---------------------------------------	---

TISAGENLEC LEUCEL (KYMRIA®)	PBMCs/ CD19/ SIN-VL/ 4-1BB-CD3z	R/R LLA- B (3-25 años),	ELIANA NCT02435849	82%	2017
		R/R	JULIET NCT02445248	50%	2018
		LBDCG,	ELARA NCT03568461	85%	2018 (FDA)
		R/R LF			
AXICABTAG ENE CILOLEUCEL (YESCARTA®)	PBMCs/ CD19/ γ-RV/ CD28- CD3z	R/R	ZUMA-1 NCT02348216	72%	2017
		LBDCG, R/R LF	ZUMA-7 NCT03391466	88%	2022 (FDA)
BREXUCABT AGENE AUTOLEUCE L (TECARTUS®)	Células T/ CD19/ γ-RV/ CD28- CD3z	R/R LCM, R/R LLA- B	ZUMA-2 NCT02601313	87%	2020 (FDA)
LISOCABTA GENE MARALEUC EL (BREYANZI®)	CD4:CD8 (1:1)/ CD19/ SIN-VL/ 4-1BB-CD3z	R/R	TRANSCEND NCT02631044	73%	2021 (FDA)
		LBDCG			
IDECAPTAG ENE VIVLEUCEL (ABECMA®)	Células T/ BCMA/ SIN-VL/ 4-1BB-CD3z	R/R MM	KARMMA NCT03361748	72%	2021 (FDA)
CILTACABT AGENE AUTOLEUCE L (CARVYKTI®)	Células T BCMA/ SIN-VL/ 4-1BB-CD3z	R/R MM	CARTITUDE-1 NCT03548207	98%	2022 (FDA)
RELMACAB TAGENE AUTOLEUCE L (CARTEYVA®)	Células T/ CD19/ SIN-VL/ 4-1BB-CD3z	R/R LBDCG	RELIANCE NCT04089215	77%	2021 (NMPA)
VARNIMCA BTAGENE- AUTOLEUCE L (ARI- 0001)	Células T/ CD19/ SIN-VL/ 4-1BB-CD3z	R/R B- LLA > 25 años	CART19-BE-01 NCT03144583 CART19-BE-02 NCT04778579	47%	2021 (AEMPS)

Tabla 2. Productos comerciales con células CAR-T. FDA: Food and Drug Administration (USA); NMPA: National Medical Products Administration Evaluation (China); AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; TR: Tasa de respuesta; PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; DI: Dominio intracelular; R/R: Recidivante/Refractario; LLA-B: leucemia linfoblástica aguda de células B; LBDCG: linfoma B difuso de células grandes; LCM: linfoma de células del manto; LF: linfoma folicular.

5.2. Limitaciones de las terapias CAR-T dirigidas a CD19

A pesar de los impresionantes resultados de las CAR-T para el tratamiento de neoplasias refractarias hematológicas, todavía hay múltiples aspectos que deben mejorarse (**Figura 9**). Los efectos secundarios graves debido a la sobreestimulación de las células CAR-T, como el síndrome de liberación de citoquinas (CRS) y la neuroinflamación, son comunes entre los pacientes tratados (Sievers et al., 2020) y pueden conducir a resultados fatales (Cai et al., 2020; Mahadeo et al., 2019). Además, las remisiones completas sostenidas varían del 62% al 42% para los pacientes tratados con productos CAR-T comerciales, lo que evidencia mucho margen de mejora (Shah, Maatman, et al., 2019; Vitale & Strati, 2020). En el caso de los tumores sólidos, las células CAR-T presentan una actividad muy limitada (Marofi et al., 2021; Shah, Maatman, et al., 2019). Por un lado, hasta el momento se han identificado pocos antígenos con expresión restringida al tejido tumoral. Por otro, la naturaleza del tumor es un aspecto crítico porque las células T deben migrar desde el torrente sanguíneo a través de las células endoteliales que forman la vasculatura del tumor, lo que dificulta la infiltración de células CAR-T. Asimismo, el microambiente del tumor a menudo es inmunosupresor, reduciendo la persistencia de las células T al inducir un estado hipofuncional. Las nuevas estrategias están orientadas a combinar múltiples funciones, como la producción de mayores niveles de ciertas citoquinas, bloqueo de los receptores inhibidores, activación de moléculas de señalización, expresión de receptores de quimiocinas o de factores que alteren la matriz extracelular del tumor.

Por otro lado, la terapia CAR-T presenta una serie de dificultades importantes asociadas al proceso de fabricación en relación con el tiempo, coste, accesibilidad o calidad de las células T:

- 1) Tiempo y coste. La fabricación de estos productos personalizados está altamente centralizada y los costes de cada producción son elevados (Fiorenza et al., 2020). El tiempo desde que se diagnostica el paciente hasta que se le puede tratar varía de 2 a 5 meses dependiendo del país

y el hospital. Durante este tiempo la enfermedad puede progresar rápidamente e incluso producirse la muerte del paciente. Además, en algunos casos, se puede producir un fallo en la fabricación del producto (entre el 2-10% de los casos) y esto conlleva a que el paciente pierde la oportunidad de recibir la terapia.

2) Viabilidad de las células T. El material de partida es clave en la eficacia de las células CAR-T. Sin embargo, el estado de las células T de cada paciente es muy variable. Las células T han podido sufrir múltiples mecanismos de inmunosupresión por parte de las células tumorales, así como el efecto de otras líneas de tratamiento. Esto puede llevar a la decisión de que el paciente no es candidato para recibir la terapia CAR-T debido al número/calidad de las células T (Torikai & Cooper, 2016).

3) Existe la posibilidad de que el producto esté contaminado con células tumorales expresando el CAR, lo que puede provocar que escapen al reconocimiento por parte de las células CAR-T (Ruella et al., 2018).

5.2.1.Efectos secundarios adversos

5.2.1.1. Síndrome de liberación de citoquinas (CRS)

La toxicidad aguda más común tras el tratamiento con CAR-T es el síndrome de liberación de citoquinas (CRS). Este consiste en una respuesta inflamatoria sistémica causada por una excesiva activación del sistema inmunitario. Las citoquinas pueden ser directamente producidas por las células CAR-T, aunque varios estudios indican que los macrófagos tienen un papel muy importante en desencadenar CRS, a través de la liberación de IL-6, IL-1 y óxido nítrico (Giavridis et al., 2018). Suele aparecer en la primera semana de tratamiento y puede ser leve, moderada o severa (grado CRS ≥ 3) dependiendo de la sintomatología (fiebre alta, taquicardia, mialgia, arritmia o hipoxia). Actualmente, tocilizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de IL-6 aprobado por la FDA, junto con los corticoesteroides son los principales fármacos usados para tratar el CRS cuando los síntomas son severos. No obstante, se intenta restringir el uso de corticoesteroides a casos de CRS refractario ya que se ha asociado a una disminución en la expansión de

las células CAR-T tras el uso de altas dosis (Davila et al., 2014). La aparición de CRS ≥ 3 tras el tratamiento con los productos CAR-T comerciales es muy variable, desde un 2% a un 46% (Gill & Brudno, 2021). El CRS severo puede ir acompañado de disfunción en la coagulación, síndrome de lisis tumoral (liberación de una gran cantidad de iones intracelulares y productos metabólicos al torrente sanguíneo que pueden generar un fallo renal agudo y sistémico), neurotoxicidad, alta incidencia de infecciones y disfunción multiorgánica.

5.2.1.2. Neurotoxicidad

El síndrome de neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunológicas (ICANS) o el síndrome de encefalopatía asociado a CAR (CRES) es otro efecto secundario recurrente de la terapia CAR-T. Este se ha relacionado con altas concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias en el líquido cefalorraquídeo e incluso con una infiltración de las células CAR-T en el sistema nervioso central (Gust et al., 2017). Los eventos neurotóxicos, como encefalopatía, dolor de cabeza, ansiedad, delirio, displasia o ataxia, suelen aparecer tras el desarrollo de CRS, con el pico de síntomas alrededor del día 7-8 (Gust et al., 2020). Aunque la mayoría de las manifestaciones son reversibles, también pueden desencadenar otras muy graves como son el edema cerebral, coma y/o convulsiones. La tasa de pacientes tratados con los CARs comerciales que han presentado neurotoxicidad de grado ≥ 3 varía del 3-32% (Gill & Brudno, 2021). Como primera línea de tratamiento se suelen usar corticoesteroides y antiepilépticos.

Hasta la fecha no existen modelos validados para predecir la aparición o severidad de CRS o ICANS, aunque sí se han reportado algunas asociaciones. Por ejemplo, la severidad de CRS se ha asociado a la expansión del tumor y la dosis de células CAR-T. En el caso de ICANS se correlaciona con CRS severo y la existencia de partida de problemas neurológicos. Esto ha llevado a modificaciones en los protocolos de administración de las células CAR-T y de intervención frente a la aparición de efectos adversos. Por ejemplo, durante el ensayo clínico con ARI-0001 se pasó de administrar una única dosis a dividirla en 3

fracciones (10%, 30% y 60%) en función de la aparición o no de CRS. Esto redujo el porcentaje de pacientes con CRS ≥ 3 de un 26.7% a un 4.3%, y a cero la mortalidad, manteniendo una eficacia comparable (Ortiz-Maldonado et al., 2021).

5.2.1.3. Toxicidades a largo plazo

Una terapia CAR-T anti-CD19 efectiva se asocia a una depleción de las células B (toxicidad *on-target off-tumor*), y una consiguiente hipogammaglobulinemia, la cual se aborda mediante la terapia de reemplazo con inmunoglobulinas.

Otra consecuencia de la terapia CAR-T, así como del régimen de pre-acondicionamiento y el tratamiento de la toxicidad a corto plazo (uso de corticoesteroides) es el riesgo de infección, llevando en algunos casos a la muerte del paciente (Hill et al., 2018). Durante el primer mes tras la infusión de las células CAR-T también son frecuentes las citopenias, que se deben tanto al pre-acondicionamiento con quimioterapia como al efecto mielosupresivo de las células CAR-T. Este hecho se corrobora con que la duración de las citopenias parece estar asociado con la severidad del CRS (Gill & Brudno, 2021).

En el caso de los pacientes que han recibido células CAR-T alogénicas tras un trasplante de médula ósea satisfactorio existe el riesgo de desarrollar la EICH (Z. Li et al., 2022).

5.2.2. Pérdida de eficacia terapéutica y recaídas

A pesar de la alta tasa de respuesta conseguida con las terapias CAR-T, las respuestas no son mantenidas en el tiempo. De hecho, hasta un 50% de los pacientes con LLA-B tratados con células CAR-T α -CD19 o α -CD22 sufrieron recaída en los siguientes 12 meses del tratamiento (Park et al., 2018). Las recaídas están asociadas principalmente a la pérdida de función de las células CAR-T o a la pérdida o disminución del antígeno diana (Jacoby et al., 2016). Las estrategias usando células CAR-T biespecíficas o una mezcla de células CAR-T con diferente especificidad

se han asociado con una reducción en la tasa de recaída, como es el caso de las células CAR-T α -CD19/CD22 (Pan et al., 2020).

Existen principalmente dos formas de recaída tras la administración de células CAR-T-CD19: recaída CD19-positiva y recaída CD19-negativa.

Las recaídas CD19-positivas suelen ocurrir a los meses de la remisión inicial como consecuencia de una limitada persistencia o baja potencia de las células CAR-T. Esta limitada persistencia suele estar asociada a las características iniciales del producto (ratio CD4:CD8, % de células T_{SCM}, el tiempo de expansión y el medio, etc) (Gardner et al., 2018), a la configuración del CAR (la afinidad del scFv por el antígeno, la región bisagra y transmembrana, y los dominios coestimuladores) (Kawalekar et al., 2016; Mao et al., 2022; Zhao et al., 2015) o al nivel de expresión del antígeno (Majzner et al., 2020) y del propio CAR (Rodríguez-Marquez et al., 2022; Weber et al., 2021).

Las recaídas CD19-negativas se deben a dos mecanismos principalmente:

1) Mutación en el gen *CD19*. Se produce la pérdida de expresión de CD19 por parte de las células tumorales debido a mutaciones genéticas (Orlando et al., 2018). También se puede producir una pérdida del epítipo reconocido por las CAR-T (FMC63 en el caso de los CARs α -CD19 aprobados) como consecuencia de una mutación genética. El estudio de *Fischer* y cols., demostró que algunas de las isoformas de CD19 responsables de la recaída tras la terapia con CART anti-CD19 ya existían previamente al tratamiento y estas se seleccionaron durante el tratamiento (Fischer et al., 2017).

2) Cambio de linaje. En varios estudios y ensayos clínicos se ha reportado que pacientes con LLA-B han desarrollado leucemia mieloide aguda (LMA) (Gardner et al., 2016; Jacoby et al., 2016).

3) Trogocitosis. La transferencia de la proteína CD19 de los blastos a las células CAR-T se denomina trogocitosis mediada por CAR. Esta resulta en el fratricidio mediado por células T y en el agotamiento de las células T (Hamieh et al., 2019).

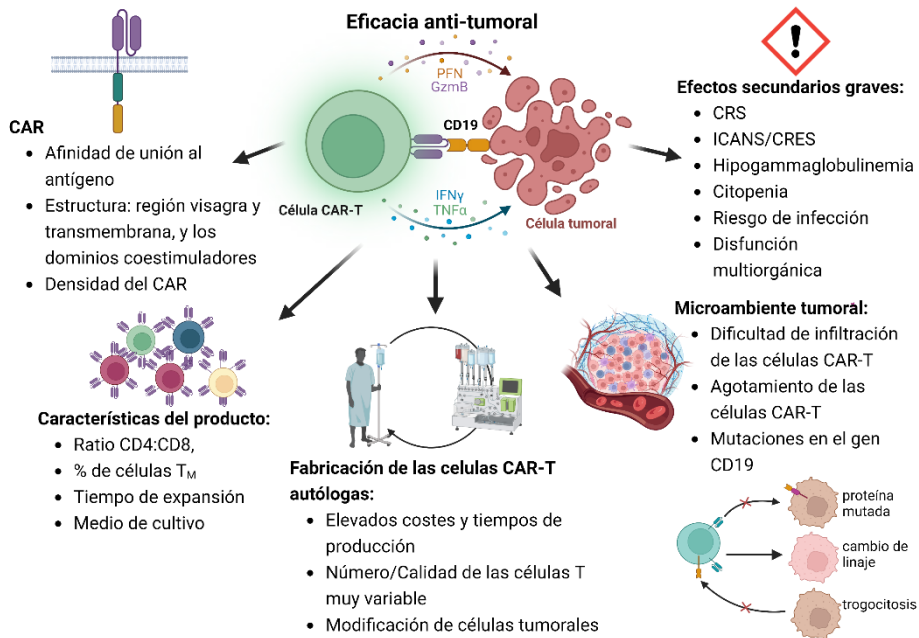


Figura 9. Factores que determinan la eficacia de la terapia CAR-T anti-CD19. La eficacia antitumoral de las células CAR-T es el resultado de un cómputo de factores: las características iniciales del producto (ratio CD4:CD8, % de células T_{SCM}, el tiempo de expansión y el medio, etc), la configuración del CAR (la afinidad del scFv por el antígeno, la región bisagra y transmembrana, y los dominios coestimuladores), nivel de expresión del antígeno y del propio CAR, toxicidad asociada, microambiente tumoral o proceso de fabricación. *Figura creada con BioRender.com.*

5.3. Nuevas estrategias

5.3.1. Incremento de la persistencia: inducción de la población memoria

Como comentamos en el apartado 1.2, el fenotipo metabólico de las células T correlaciona directamente con su persistencia en el paciente y por lo tanto con su eficacia antitumoral. Son muchos los trabajos que indican que células T con capacidad de responder a una demanda energética elevada (elevado SCR), un elevado metabolismo basal oxidativo (altos niveles de ATP mitocondrial) así como con una alta tasa de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en la mitocondria presentan un incremento de la persistencia y de la función efectora tras la transferencia adoptiva (Chang & Pearce, 2016; Rostamian et al., 2021). Muchos autores han demostrado que la intervención metabólica de las

células T durante su expansión previa a la TCA puede inducir su modulación o reprogramación de las vías metabólicas.

5.3.1.1. Agonistas mitocondriales

Una de las características que hacen que las células T memoria tengan un estado metabólico mejor es el hecho de que presentan mayor masa mitocondrial. El receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) y su coactivador PGC-1 α son reguladores de la biogénesis mitocondrial y modulan la actividad OXPHOS y FAO. Se ha visto que la transferencia adoptiva de células T o linfocitos infiltrantes de tumor sobreexpresando PGC-1 α presentan una mayor capacidad de expansión cuando se re-encuentran con el antígeno como consecuencia de una mayor actividad mitocondrial (Chowdhury et al., 2018; Dumauthioz et al., 2021; Scharping et al., 2016).

5.3.1.2. Inhibición de rutas metabólicas

Una de las principales rutas metabólicas que han sido altamente intervenidas para controlar la diferenciación de las células T es la ruta PI3K/Akt, en concreto, Akt ha constituido una de las primeras dianas. La inhibición de Akt, así como de sus isoformas, Akt1 y Akt2, ha demostrado promover la expansión de células T_M (Abu Eid et al., 2015; Crompton et al., 2015; Kim et al., 2012; Klebanoff et al., 2017). Varios estudios han generado células T expresando un CAR o TCR específico manteniendo una alta población de T_M y una mejor eficacia antitumoral mediante la inhibición de Akt durante su expansión *ex vivo* (Klebanoff et al., 2017; Urak et al., 2017). Klebanoff y cols., generaron células CAR-T α -CD19 a gran escala en presencia de un inhibidor de Akt (iAkt VIII), obteniendo una mayor eficacia terapéutica que con las células CAR-T convencionales. De hecho, este estudio propició el uso del inhibidor de Akt en un ensayo clínico (NCT03139370). La inhibición de PI3K δ o PI3K γ (por separado, ya que la co-inhibición reduce la actividad antitumoral) (Dwyer et al., 2020), también ha retrasado la diferenciación de células T específicas de tumor, (Abu Eid et al., 2017; Bowers et al., 2017) y células CAR-T (Dwyer et al., 2020; Zheng et al., 2018), mejorando su persistencia

in vivo y actividad terapéutica. Otra diana cuya inhibición teóricamente aumentaría la persistencia de las células T es mTOR. Sin embargo, el uso de rapamicina u otros análogos para inhibir directamente mTORC1 ha generado resultados contradictorios (Araki et al., 2009; Chaoul et al., 2015; Scholz et al., 2016; Wang et al., 2011). El inhibidor TWS119 (inhibidor de GSK3B) ha sido ampliamente usado en diferentes estrategias para la inducción de células T madre memoria (Scholz et al., 2016);(Sabatino et al., 2016). Sabatino y cols, desarrollaron un protocolo para la generación de células CAR-T_{SCM} a partir de aféresis de pacientes. Para ello sortearon células T_N, y estas fueron modificadas para expresar el CAR y cultivadas en presencia de IL- 7, IL-21 y TWS119. El uso de TWS119 permitió la estabilización de la β -catenina y una alta expresión de *TCF7* y *LEF1*. Este nuevo producto resultó tener más eficacia que células CAR-T generadas de forma estándar en un modelo de leucemia. Por todo lo anteriormente expuesto, la inhibición de la señalización del eje PI3K/Akt representa una estrategia establecida para mejorar la terapia celular adoptiva de células T.

Recientemente se han investigado otras posibles dianas para su inhibición, como es el transportador de piruvato mitocondrial (MPC). Durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Pedro Romero estuve involucrada en un estudio (Wenes et al., 2022) donde la expansión de células CAR-T en presencia de un inhibidor de MPC resultó en una actividad antitumoral superior en un modelo de leucemia. Esto es debido a que la inhibición de MPC facilita la producción de acetil-CoA mediante la oxidación de glutamina y ácidos grasos, lo que da como resultado una mayor acetilación de histonas y accesibilidad a los genes pro-memoria.

La glutamina juega un papel crucial en el metabolismo anabólico aportando carbono y nitrógeno. La glutamina es convertida en glutamato, y este convertido a α -cetoglutarato que entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Leone y cols., (Leone et al., 2019) demostraron que la inhibición del metabolismo de la glutamina usando un antagonista de la glutamina (6-diazo-5-oxo-L-norleucina, DON) generó una serie de cambios transcripcionales en las células T asociados con un

fenotipo memoria. Estos cambios parecen estar asociados a un incremento en la metilación como consecuencia de una disminución en la actividad de las demetilinas dependientes de α -cetoglutarato. Las células T tratadas con DON presentaron una supresión de la glucólisis, un incremento en la tasa de OXPHOS y una elevada SRC.

5.3.1.3. Cultivo con cócteles de citoquinas

Otra estrategia para potenciar la respuesta antitumoral de las células T consiste en modificar las condiciones de cultivo durante su expansión para promover un mejor fenotipo. IL-2 ha sido la citoquina de excelencia para expandir las células T *in vitro* como paso previo a la terapia celular adoptiva. Sin embargo, en los últimos años el cultivo con IL-7 e IL-15 ha demostrado mejorar la capacidad mitocondrial (van der Windt et al., 2012), así como un incremento en la población T madre memoria (Arcangeli et al., 2020; Cieri et al., 2013; Richer et al., 2015; Xu et al., 2014), sustituyendo progresivamente a la IL-2. Aunque otros estudios avalan el uso de la IL-2, demostrando que el cultivo con una baja concentración de IL-2 también se relaciona con la generación de células T memoria (Kaartinen et al., 2017). La citoquina IL-21 es capaz de suprimir la diferenciación de las células T *naïve* a células T efectoras e inducir un fenotipo de diferenciación temprano (T_{SCM}). Esta inhibición ha resultado en una capacidad antitumoral *in vivo* superior a la de células expandidas en presencia de otras citoquinas (Alvarez-Fernandez et al., 2016; Hinrichs et al., 2008; Moroz et al., 2004). No obstante, a día de hoy el papel de IL-21 es polémico, ya que hay evidencia que sugiere que su efecto en la diferenciación de las células T es variable (Tian & Zajac, 2016).

5.3.2. Control de la expresión del CAR

Como hemos comentado previamente, múltiples factores intervienen en la eficacia de la terapia CAR-T. Uno de los cuales cada vez está adquiriendo mayor protagonismo es la densidad de moléculas CAR en la membrana de las células T. Diferentes trabajos han demostrado la importancia de controlar los niveles del CAR en la superficie de las células CAR-T para optimizar su actividad terapéutica (Eyquem et al.,

2017; Rodríguez-Marquez et al., 2022; Tristán-Manzano et al., 2022). Uno de los primeros trabajos que desmontó el hito de “a mayor expresión del CAR, mayor eficacia” fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Sadelain. El cual generó por primera vez las células TRAC-CAR-T, en las que usando el sistema CRISPR/Cas9 y vectores VAAr (vectores basados en virus adenoasociados recombinantes, no integrativos) insertaron el ADNc del CAR en el locus *TRAC*. Esto hizo que la expresión del CAR dependiera del promotor del TCR, logrando una bajada en la expresión del CAR tras el encuentro con el antígeno (tal y como ocurre con el TCR). Esta expresión fisiológica del CAR resultó en una reducción de la señalización en ausencia de antígeno (lo que se conoce como señalización tónica), un fenotipo más memoria y menos agotado de las células CAR-T, lo que llevó a una mayor eficacia antitumoral y menor toxicidad en comparación con las células CAR-T generadas por transducción retroviral (Eyquem et al., 2017). Por lo tanto, una expresión más regulada del CAR, que permita la eliminación del tumor pero sin generar una sobreactivación de las células T, evitaría el agotamiento de las células CAR-T. Otras estrategias han perseguido controlar los niveles del CAR en superficie modificando el promotor utilizado para su expresión (Ho et al., 2021; Tristán-Manzano et al., 2022), induciendo la degradación del CAR o inhibiendo la señalización del CAR (Weber et al., 2021).

Los vectores lentivirales se han postulado como la principal herramienta para transferir el CAR a células T humanas CD4 y CD8 con alta eficiencia, pero su nivel de expresión depende del promotor que controla su transcripción. La selección de un promotor adecuado es un paso fundamental para el éxito de la terapia CAR-T. El promotor es un elemento que actúa en *cis* dentro del esqueleto del vector, que dicta el nivel y la duración de la expresión del transgén, y puede restringir la expresión a tejidos/células específicos. Se han evaluado promotores de diferentes orígenes para la expresión transgénica en células T: virales (citomegalovirus (CMV), virus de células madre murinas (MSCV) o virus formador de focos de bazo (SFFV)); celulares (subunidad 1 α del factor de elongación humano (EF1 α) o fosfoglicerato quinasa humana (PGK) o

la ubiquitina C humana (UbiC)); y quiméricos (MND y RPBSA). Siendo MSCV y EF1 α los promotores más utilizados para la expresión del CAR en células T (Kymriah, Breyanzi, Abecma, Carvykti, Carteyva y ARI-0001 utilizan EF1 α , Yescarta y Tecartus contienen MSCV). Ambos son promotores fuertes que permiten una expresión alta y constitutiva del transgén en células T (Kochenderfer et al., 2009; Milone et al., 2009). Sin embargo, como se ha mencionado, las altas concentraciones de CAR en la superficie de las células T pueden dar lugar a una agrupación espontánea de los CAR (independiente del ligando) que conduce a la señalización tónica (Ajina & Maher, 2018; Gomes-Silva et al., 2017). Esta señalización tónica puede afectar la seguridad (secreción de citoquinas proinflamatorias en tejidos no diana) y la eficacia (agotamiento prematuro debido a la proliferación continua) de las células CAR-T. En esta dirección e intentando mimetizar el trabajo del Dr. Sadelain pero sin la necesidad de edición genómica, nuestro grupo ha demostrado que mimetizar el patrón de expresión del TCR a través del promotor es una estrategia factible para mejorar la seguridad de la terapia CAR-T y disminuir el agotamiento de las células T (Tristán-Manzano et al., 2022). En concreto, nuestro grupo ha desarrollado los VLs-AW, que contienen un promotor quimérico basado en el promotor del gen *WAS* (síndrome de Wiskott-Aldrich) el cual permite una expresión fisiológica del transgén en células T (patente: Polynucleotide for safer and more effective immunotherapies- WO2020099572). La expresión del CAR en células T mediante VLs-AW consiguen que el CAR mimetice la cinética de expresión del TCR (*TCR like*), mejorando la calidad del producto CAR-T en varios aspectos al evitar la sobre-estimulación de las células CAR-T. Por un lado, reduce la liberación de citoquinas, lo que podría contribuir a reducir los efectos secundarios y, por otro, reduce el agotamiento de las células T, mejorando su fenotipo y eficacia.

6. CÉLULAS CAR-T UNIVERSALES

Aunque todos los productos hasta ahora aprobados se basan en el uso de células autólogas, los inconvenientes asociados a las mismas (tiempo de fabricación, coste, disfunción de las células T, gran variabilidad entre

los productos, (ver punto 5.2)) están abriendo paso al uso de células alogénicas “listas para usar” (**Tabla 3**). Convertir esta terapia en universal permitiría la producción a gran escala y la fabricación por lotes, incrementando en gran medida la calidad y accesibilidad de los productos CAR-T. Sin embargo, el uso de células alogénicas está asociado con dos problemas principales: 1) las células T alogénicas administradas pueden causar EICH, potencialmente mortal; y 2) El sistema inmunitario del huésped puede eliminar rápidamente estas células T alogénicas, lo que limita su actividad antitumoral.

Las posibles fuentes de células T alogénicas que están siendo exploradas en ensayos clínicos son: sangre de adultos sanos, sangre de cordón umbilical, células T virus-específicas, células T $\gamma\delta$ y células T inducidas a partir de células madre pluripotentes (iPSCs) (**Figura 10, Tabla 4**).

Los primeros ensayos con células alogénicas se realizaron en pacientes que habían recaído tras recibir un trasplante de médula ósea, y las células CAR-T fueron producidas a partir de las células del donante o del paciente. En algunos de los cuales se reportó el desarrollo de EICH aguda, así como una menor expansión de las células CAR-T (Hu et al., 2019). Además, este procedimiento no elimina el formato personalizado de la terapia. La estrategia más seguida por los investigadores y clínicos consiste en la generación de células CAR-T universales (UCAR-T), esto son células CAR-T de donantes sanos en las que la expresión del TCR ha sido eliminada. Esto se ha conseguido principalmente mediante las herramientas de EG.

	CÉLULAS CAR-T AUTÓLOGAS	CÉLULAS CAR-T ALOGÉNICAS
FUENTE CELULAR	Propio paciente	Donante sano
PREPARACIÓN	Paciente-específica	Producción masiva
COSTE/PACIENTE	Muy elevado	Bajo
DISPONIBILIDAD	Semanas-meses	Inmediata
APLICACIÓN EN NEOPLASIAS TIPO T	Restringida	Posible

LIMITACIONES	Número y calidad de las células T	Menor amplificación y persistencia <i>in vivo</i>
RIESGOS	CRS, CRES, contaminación con células tumorales	CRS, CRES, EICH

Tabla 3. Comparación entre la terapia CAR-T autóloga y alogénica. CRS: síndrome de liberación de citoquinas; CRES: síndrome de encefalopatía asociado a CAR; EICH: enfermedad de injerto contra huésped.

6.1. Edición génica de las células CAR-T alogénicas

Para la eliminación del TCR, se han usado como dianas los loci *TRAC* (cadena α constante del receptor de células T) o *TRBC* (cadena β constante del receptor de células T). La estrategia más común es editar el locus *TRAC*, ya que la cadena α tiene solo una región constante, por lo que solo se necesita generar un único corte. Desde el primer estudio en 2012 en el que se eliminó el TCR utilizando ZFNs (Torikai et al., 2012) se han realizado muchos estudios utilizando diferentes nucleasas y estrategias. Más tarde, Poirot y cols., realizaron la primera edición génica múltiple, es decir, la modificación de dos o más sitios específicos en el genoma, en células CAR-T anti-CD19. Utilizaron la tecnología TALEN para editar los genes *TCR* y *CD52* simultáneamente. CD52 es una proteína de superficie que se expresa en linfocitos maduros y por tanto es usada como diana para la linfodepleción previa (alemtuzumab junto con fludarabina y ciclofosfamida) y así evitar el rechazo de las células CAR-T. Estas células T doble editadas no causaron EICH, fueron capaces de eliminar a las células tumorales *in vivo* y no respondieron al anticuerpo monoclonal anti-CD52 (alemtuzumab) (Poirot et al., 2015). La misma estrategia se aplicó a células T que expresan un CAR anti-BCMA para el tratamiento del mieloma múltiple, obteniendo una actividad *in vivo* similar a las células CAR no editadas (Sommer et al., 2019). Otra estrategia utilizada para aumentar la persistencia de las células CAR-T alogénicas consiste en utilizar análogos de nucleótidos de purina como régimen de pre-acondicionamiento para la depleción de linfocitos y eliminar el gen *DCK* (desoxicitidina quinasa) junto al *TCR* en las células CAR-T (Valton et al., 2015). Ren y cols., fueron pioneros en la edición múltiple de más de dos sitios del ADN. Generaron células CAR-T anti-

CD19 deficientes para TCR y hasta tres moléculas más, como β -2 microglobulina (*B2M*, una subunidad esencial de la molécula HLA-I), PD1, CTLA4 o Fas (CD95) utilizando el sistema CRISPR/Cas9 y en un único paso (los ARNg se incorporaron junto con el ADNc del CAR en el vector lentiviral). La eficacia disminuyó a medida que aumentó el número de genes diana (Ren, Zhang, et al., 2017). Simultáneamente, el mismo equipo realizó una edición doble o triple del genoma de los loci *TCR*, *B2M* y *PDCD1*, pero en este caso el sistema CRISPR/Cas9 se entregó como ARN. Las células CAR-T editadas por triplicado presentaron respuesta alogénica reducida y una actividad antitumoral mejorada en un modelo de leucemia Nalm-6-PDL1+ (Ren, Liu, et al., 2017). Como se ha mencionado anteriormente, el Dr. Sadelain demostró que la generación de células T TRAC-CAR-T (TCRKO y CAR expresado desde el locus *TRAC*) presentaban una mayor actividad antitumoral en un modelo de ratón con LLA, manteniendo un fenotipo menos agotado y menos diferenciado (Eyquem et al., 2017). Múltiples estudios han seguido esta estrategia usando diferentes herramientas (Hale et al., 2017; Jo et al., 2022; Kath et al., 2022; MacLeod et al., 2017; Mueller et al., 2022; Sachdeva et al., 2019; Wiebking et al., 2021).

Para la disrupción de genes en células T se han utilizado ampliamente diferentes nucleasas que generan roturas de doble cadena, lo que puede producir efectos no deseados. Como alternativa, los editores de bases CRISPR-Cas9 permiten la modificación de nucleótidos en el locus diana sin generar DSBs, induciendo codones de parada prematuros o interrumpiendo los sitios de empalme (SA o SD). Usando editores de base de citidina de primera generación, se han generado células T editadas con alta eficiencia, obteniendo hasta células CAR-T anti-CD19 triple negativas (*TRAC*, *B2M*, *PDCD1*), que mostraron una capacidad antitumoral mejorada *in vitro* (Webber et al., 2019). La octava generación del editor de base de adenina (ABE8s) dirigido a secuencias de ADN para modificar sitios de empalme también se ha aplicado en células T primarias, con el objetivo de editar los genes *B2M*, *CIITA* (gen que codifica para una proteína que forma parte del complejo HLA II) y *TRAC*, obteniendo >98% de eficiencia de triple edición (Gaudelli et al., 2020).

6.2. Desarrollo clínico de las células CAR-T universales

En la primera prueba clínica se administró el producto UCART19, células CAR-T anti-CD19 negativas para TCR y CD52 desarrollado por Collectis usando su tecnología TALEN, a dos pacientes pediátricos con LLA-B en recaída. Ambos presentaron remisión del tumor y sin desarrollar EICH significativa, tras lo cual recibieron un trasplante de médula ósea (Qasim et al., 2017). Tras estos resultados esperanzadores se llevaron a cabo tres ensayos clínicos usando las células UCART19: en niños con LLA-B (NCT02808442, PALL), adultos con LLA-B (NCT02746952, CALM) y en pacientes con neoplasias linfoides avanzadas (NCT02735083). Los ensayos PALL y CALM ya han sido completados, obteniendo una supervivencia total del 55% (Benjamin et al., 2020). Los nuevos productos basados en UCART19 son ALLO-501 (NCT03939026), con una fabricación mejorada, y ALLO-501A (NCT04416984), que elimina el dominio de reconocimiento de rituximab.

Usando una estrategia similar se han generado células CAR-T anti-BCMA universales (ALLO-715, NCT04093596, y ALLO-605, NCT05000450); UCARTCS1A (NCT04142619) para pacientes con R/R MM; células CAR-T anti-CD22 universales (UCART22) para tratar pacientes con R/R LLA-B (NCT04150497, BALLI-01); así como células CAR-T anti-CD123 (UCART123), para la neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (NBCDP) (NCT03203369, ABC123) y LMA recidivante (NCT03190278, AMELI-01).

La tecnología CRISPR/Cas9 también ha sido ampliamente usada para la generación de células UCAR-T. El producto CTA101, desarrollado por la empresa China Bioheng Biotech usando CRISPR/Cas9, constituye el primer CAR-T universal dirigido frente a dos antígenos, CD19 y CD22. Recientemente, se han publicado los resultados del producto TT52CAR19 (NCT04557436), células CAR-T anti-CD19 en las que la expresión de TRAC y CD52 ha sido eliminada mediante CRISPR/Cas9 siguiendo una estrategia todo en uno (ARNg incluido en el 3'LTR del vector lentiviral que expresa el CAR). Cuatro de los seis pacientes con

LLA-B tratados experimentaron remisión y recibieron un trasplante de médula ósea (Ottaviano et al., 2022). Therapeutics AG tiene en marcha multitud de ensayos con células CAR-T universales generadas con la tecnología CRISPR/Cas9.

La empresa Precision BioSciences ha generado diferentes productos CAR-T alogénicos (PBCAR) mediante la inserción del CAR en el locus *TRAC* empleando su plataforma ARCUS, basada en la meganucleasa I-Crel.

También se ha realizado la inactivación del gen *TCR* para generar células CAR-T anti-CD3 resistentes al fratricidio para tratar LLA de células T. Para tratar las neoplasias malignas de células T, se han desactivado otros marcadores como CD7. Usando CRISPR/Cas9, las células CAR-T anti-CD7 (UCART7) mediaron la destrucción eficiente de las células T malignas sin presentar un fratricidio de células T significativo (Gomes-Silva, 2017; Cooper et al, 2018).

La terapia CAR-T universal sin edición génica también está siendo evaluada en pacientes. La compañía Celyad ha llevado a cabo varios ensayos clínicos con CYAD-101 (NCT04167696 y NCT04613557), un producto de células UCAR-T dirigido a NKG2D que además expresa un péptido truncado (CD3z) para interferir con la señalización del TCR (Michaux et al., 2022). Otros CAR-T alogénicos fabricados sin edición génica que están siendo estudiados en clínica son LUCAR (NCT04176913) y ThisCART (NCT04601181, NCT05127135, NCT05106907, NCT04384393, NCT05106946).

PRODUC -TO	DIANA	ESTRATEGIA	FASE	CÓDIGO NCT	INDICA- CIÓN
CÉLULAS CAR-T ALOGÉNICAS CON EG					
CTA101	CD19/ CD22	Células T TRAC KI (CAR) y CD52 KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04227015/ NCT04154709/ NCT04026100	R/R neoplasias tipo B
RD13-01	CD7	Células T CD7 KO, TRAC KO, RFX5 KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04538599/ NCT04620655	R/R Neoplasias tipo T/NK
CART-33	CD33	Células T TRAC KO	I	NCT02799680	R/R LMA

ANTI-CD7 UCAR-T	CD7	Células T TRAC KO, CD7 KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04264078	Neoplasias tipo T/NK
UCART19	CD19	Células T TRAC KO y CD52 KO (TALENs)	I	NCT02746952	R/R LLA-B adulta
UCART19	CD19	Células T TRAC KO y CD52 KO (TALENs)	I	NCT02808442	R/R LLA-B pediátrica
UCART19	CD19	Células T TRAC KO y CD52 KO (TALENs)	I	NCT02735083	Seguimiento o pacientes tratados con UCART19
UCART123	CD123	Células T TRAC KO (TALENs)	I	NCT03203369	NBCDP
UCART123	CD123	Células T TRAC KO (TALENs)	I	NCT03190278	R/R LMA
UCARTCS1 A	CS1	Células T TRAC KO, CS1 KO (TALENs)	I	NCT04142619	R/R MM
UCARTCLL 1	CLL1	Células T TRAC KI (CAR), B2M KO (TALENs)	I	NCT05252572	LMA
UCART22	CD22	Células T TRAC KO, CD52 KO (TALENs)	I/II	NCT04150497	R/R LLA-B
CD19-UCART	CD19	Células T TRAC KO, B2M KO (CRISPR/Cas9)	/	NCT03229876/ NCT05381181/ NCT05105867/ NCT04264039/ NCT04166838	R/R LLA-B/LNH-B
BCMA-UCART	BCMA	Células T TRAC KO, B2M KO (CRISPR/Cas9)	/	NCT03752541	MM
CÉLULAS CAR-T DUALES UCART019	CD19/C D20 O CD22	Células T TRAC KO, B2M KO (CRISPR/Cas9)	I/II	NCT03398967	Neoplasias tipo B
CD19-CAR.CD45 RA-	CD19	Células T TRAC KO, B2M KO (CRISPR/Cas9)	I/II	NCT03166878	R/R Neoplasias tipo B
CD19-CAR.CD45 RA-	CD19	Células T CD45RA-donante no compatible	I	NCT04881240	R/R Leucemia tipo B
P-BCMA-ALLO1	BCMA	Células T TRAC KO, B2M KO (Cas-CLOVER*), CAR insertado con PB	I	NCT04960579	R/R MM

ALLO-501	CD19	Células T TRAC KO, CD52 KO (TALENs)	I	NCT03939026	R/R LBDCG /LF
ALLO-501A	CD19	Células T TRAC KO, CD52 KO (TALENs)	I/II	NCT04416984	R/R LBDCG
ALLO-605	BCMA	Células T TRAC KO, CD52 KO (TALENs)	I/II	NCT05000450	R/R MM
ALLO-715	BCMA	Células T TRAC KO, CD52 KO (TALENs)	I	NCT04093596	R/R MM
WU-CART-007	CD7	Células T CD7 KO, TRAC KO (CRISPR/Cas9)	I/II	NCT04984356/ NCT05377827	R/R Neoplasias tipo T
PACE CART19	CD19	Células T TRAC KO, B2M KO, CIITA KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT05037669	R/R Neoplasias tipo B
CB-010	CD19	Células T TRAC KI (CAR), PD1 KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04637763	R/R LNH-B
PBCAR019 1	CD19	Células T TRAC KI (CAR) (MN ARCUS)	I/II	NCT03666000	R/R LNH-B/LLA-B
PBCAR19B	CD19	Células T TRAC KI (CAR) (MN ARCUS), Inhibición B2M, Expresión HLA-E	I	NCT04649112	Neoplasias tipo B
PBCAR20A	CD20	Células T TRAC KI (CAR) (MN ARCUS)	I/II	NCT04030195	R/R LNH-B/LLC-B/LLCP
PBCAR269 A	BCMA	Células T TRAC KI (CAR) (MN ARCUS)	I/II	NCT04171843	R/R MM
CD123 CAR-CD28-CD3ZETA-EGFRT-CTX130	CD123	No especificado	I	NCT02159495	R/R LMA NBCDP
CTX130	CD70	Células T TRAC KI (CAR), B2M KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04502446	Linfoma T
CTX120	BCMA	Células T TRAC KI (CAR), B2M KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04244656	R/R MM
CTX110	CD19	Células T TRAC KI (CAR), B2M KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04035434	R/R Neoplasias tipo B

PBLTT52C AR19	CD19	Células T TRAC KO, CD52 KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04557436	LLA-B
CÉLULAS CAR-T	CD19	Células T TRAC y CD52 KO (TALENS)	I/II	NCT05164042	R/R LLA-B
CÉLULAS CAR-T	CD19	Células T TRAC y CD52 KO (TALENS)	I/II	NCT05143112	R/R linfoma B
CTA30X UCAR-T	CD19	No especificado	I	NCT05015972	R/R neoplasias tipo B
CT125A	CD5	Células T TRAC KO, CD5 KO (CRISPR/Cas9)	I	NCT04767308	Neoplasias CD5+
CÉLULAS CAR-T ALOGÉNICAS SIN EG					
CAR19- TTREG	CD19	Células T reguladoras	I/II	NCT05114837	R/R LLA-B
CART-19	CD19	Células T de un donante compatible	I	NCT02799550	R/R LLA-B
CÉLULAS CAR-T	CD19	Células T de un donante compatible	I	NCT02050347	R/R Neoplasias tipo B post- trasplante de médula ósea
ALLOCART -19	CD19	Células T de un donante compatible	I	NCT04173988	R/R LLA-B pediátrica
LUCAR- 20S	CD20	Células T de un donante compatible	I	NCT04176913	R/R LNH-B
THISCART 22	CD22	No especificado	I	NCT04601181/ NCT05106946	R/R Neoplasias tipo B
THISCART 7	CD7	No especificado	I	NCT05127135	R/R Neoplasias tipo T
THISCART 19	CD19	No especificado	I	NCT04384393/ NCT05106907	R/R Neoplasias tipo B
KCAT19	CD19	Células T de sangre de cordón de un donante compatible	I	NCT05391490	Neoplasias tipo B

CÉLULAS CAR-T	CD19	Células T de sangre de cordón de un donante compatible. CAR insertado con SB	I	NCT01362452	Neoplasias linfoides tipo B post-trasplante de SCU
FT819	CD19	Células T derivadas de iPSCs TRAC KI (CAR) usando CRISPR/Cas9	I	NCT04629729	Neoplasias tipo B
ADI-001	CD20	Células T V δ 1 γ δ alogénicas	I	NCT04735471	Neoplasias tipo B
CÉLULAS CAR-TΓA	CD19	Células Ty δ	/	NCT04796441/ NCT05388305	R/R LMA
CÉLULAS CAR-TΓA	CD19	Células Ty δ	I	NCT02656147	Neoplasias tipo B
CÉLULAS CAR-TΓA	CD7	Células Ty δ		NCT04702841	Neoplasias tipo T
CD30.CAR -EBVSTS	CD30	Linfocitos T citotóxicos específicos para EBV	I	NCT04288726	Linfomas CD30+
EBV-CTLS	CD19	Linfocitos T citotóxicos específicos para EBV	I	NCT01430390	Neoplasias tipo B
CD19.CAR - MULTIVSTS	CD19	Linfocitos T citotóxicos multi-virus específicos	I	NCT03768310	LLA-B, LNH-B

Tabla 4. Resumen de los ensayos clínicos con células CAR-T alogénicas para neoplasias hematológicas. EG: edición genómica; R/R: Recidivante/Refractario; KO: knock out; KI: knock in; LLA-B: leucemia linfoblástica aguda de células B; LNH-B: linfoma no Hodgkin de células B; LLC-B: leucemia linfocítica crónica de células B; MM: mieloma múltiple; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA-T: leucemia linfoblástica aguda de células T; LLB-T: linfoma linfoblástico de células T; NBCDP: neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides; LLCP: linfoma linfocítico de células pequeñas; SCU: sangre de cordón umbilical; EBV: virus Epstein-Barr. *Cas-CLOVER funciona similarmente a CRISPR/Cas9 pero usa la nucleasa Clo051 unida a una Cas9 muerta (dCas9) guiada por dos ARNg.

6.3. Desafíos de la terapia CAR-T universal

6.3.1.EFICACIA

Uno de los principales desafíos de la tecnología UCAR-T es su persistencia en el paciente. Para evitar que las células UCAR-T sean atacadas y rechazadas por el sistema inmunitario del huésped, el régimen de linfodepleción previo a la infusión de células UCAR-T es más intensivo que el anterior a la terapia CAR-T autóloga. Además, si las células UCART se infunden de forma recurrente, es necesario realizar una re-linfodepleción para mantener su persistencia *in vivo*. Estos tratamientos conducen a una mielo-supresión grave, lo que aumenta en gran medida el riesgo de hemorragia e infección. Como hemos descrito anteriormente, existen varios trabajos que combinan la disrupción del TCR y HLA de clase I o II, para reducir tanto la alorreactividad como el reconocimiento inmunológico por parte del paciente, aumentando la persistencia de células CAR-T alogénicas (**Figura 10**). La estrategia más utilizada para eliminar las moléculas HLA de clase I consiste en la eliminación de la $\beta 2$ microglobulina (Ren et al., 2017; Liu et al., 2017, etc). La depleción de las moléculas HLA de clase II se puede lograr dirigiéndose a factores reguladores como CIITA, RFX5 o RFXANK (Krawczyk et al., 2004). Sin embargo, la ausencia de estas moléculas en la superficie celular puede desencadenar el reconocimiento y posterior destrucción por las células NK. Por este motivo, en algunos casos la disrupción de B2M se acompaña de expresión de moléculas HLA no clásicas, como HLA-E o HLA-G (Gornalusse et al., 2017), ligandos de los receptores inhibidores siglec7 y siglec9 y/o de la eliminación de CD155, un ligando activador (Wang et al., 2021).

6.3.2.SEGURIDAD

Como hemos comentado, el uso de las herramientas de edición génica trae consigo el riesgo de insertar mutaciones y alterar genes no deseados, por lo que existe un riguroso seguimiento de todos los pacientes tratados con los productos UCAR-T. En octubre de 2021, la FDA paró todos los ensayos clínicos con los productos CAR-T alogénicos

de Allogene Therapeutics, desarrollados usando la tecnología TALEN de Collectis. Esta suspensión fue introducida tras la detección de células CAR-T anti-CD19 con anomalías cromosómicas en la biopsia de médula ósea de un paciente con linfoma folicular transformado en estadio IV que desarrolló anemia aplásica secundaria después del tratamiento con ALLO-501A. Sin embargo, los investigadores confirmaron que esta alteración no estaba relacionada con el proceso de edición genómica. La anomalía fue un evento aislado y no se detectó en ningún otro paciente tratado con el mismo lote de ALLO-501A o cualquier producto ALLOCAR-T, por lo que la FDA anunció el fin de esta suspensión clínica en enero de 2022 (Sheridan, 2022). Recientemente, se ha reportado una inversión en el cromosoma 14 en un paciente que había recibido células CAR-T alogénicas editadas con TALEN para eliminar la expresión de los genes *TCR* y *CD52*. Tras analizar los sitios de ruptura, dicha inversión se ha relacionado con una recombinación mediada por las enzimas codificada por el gen activador de recombinación (RAG) de manera espontánea (Sasu et al., 2022).

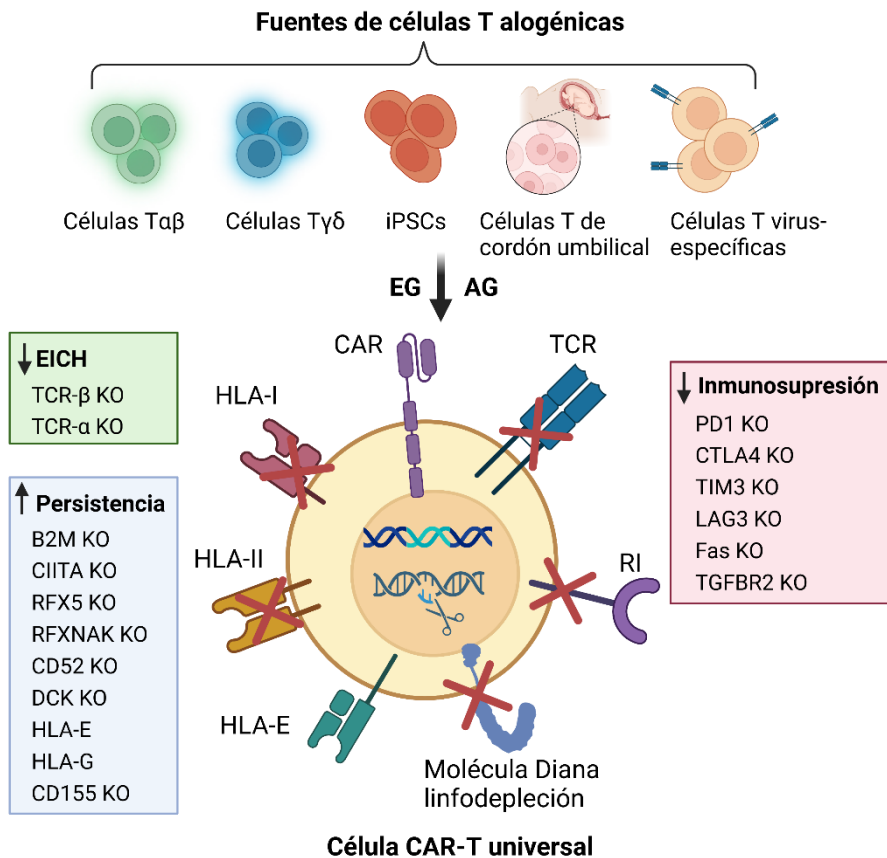


Figura 10. Fuentes celulares y estrategias de edición genómica para generar productos CAR-T universales. Las posibles fuentes de células T alogénicas que están siendo exploradas en ensayos clínicos son: sangre de adultos sanos, sangre de cordón umbilical, células T virus-específicas, células Tγδ y células T inducidas a partir de células madre pluripotentes (iPSCs). Todas ellas son susceptibles de sufrir edición genómica (EG) y adición génica (AG) para aumentar la seguridad y potencia de las células CAR-T. La eliminación del TCR endógeno aborda las barreras de histocompatibilidad. La persistencia de las células TCRKO CAR-T se puede mejorar mediante la interrupción de las moléculas del HLA de clase I (eliminando β2 microglobulina (B2M)) o del HLA clase II (a través de la eliminación de CIITA o RFXANK), junto con la expresión de un inhibidor de células NK (como HLA-E o HLA-G). También se puede aumentar la resistencia al régimen de linfodepleción eliminando CD52 para la resistencia al anticuerpo anti-CD52, o eliminando el gen de la desoxicitidina quinasa (DCK) para la resistencia a análogos de nucleótidos de purina. Las células CAR-T alogénicas pueden modificarse para contrarrestar algunos mecanismos de inmunosupresión en el microambiente tumoral, como la interrupción de los receptores inhibidores (RIs) o moléculas que median la apoptosis celular como el receptor Fas. *Figura creada con BioRender.com.*

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

La terapia adoptiva con células T modificadas genéticamente representa el nuevo pilar de la inmunoterapia. Entre ellas, las células T modificadas con receptores quiméricos dirigidos a antígenos tumorales (células CAR-T) han sido particularmente exitosas para el tratamiento de cánceres hematológicos. Esta notable actividad terapéutica ha resultado en la aprobación de seis productos CAR-T por parte de la FDA/EMA. En España, la terapia con células CAR-T ARI-0001 ha sido aprobado para 'exención hospitalaria' por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para los pacientes con LLA-B mayores de 25 años.

A pesar del destacado beneficio clínico de las células CAR-T, aún existen desafíos importantes asociados con el proceso de fabricación, ya que esta terapia se basa en el uso de células T del propio paciente (autólogas). Este requerimiento reduce significativamente el número de pacientes que pueden verse beneficiados por las terapias CAR-T. Los principales cuellos de botella son: 1) las dificultades de producción a partir de pacientes con un sistema inmune comprometido; 2) el tiempo de espera para poder administrar el producto terapéutico, y 3) muchos pacientes no cumplen los requisitos mínimos para poder ser tratados con CAR-T.

La mayoría de estas limitaciones se pueden superar mediante la fabricación de células CAR-T utilizando células T de donantes sanos. Para generar estos productos alogénicos y evitar la enfermedad de injerto contra huésped, han surgido diferentes estrategias. Una de las más utilizadas consiste en el uso de la edición génica para interrumpir aquellos genes involucrados en dicha respuesta.

Por otro lado, las características fenotípicas del producto inoculado están altamente involucradas en su eficacia. Existe una alta evidencia de que una mayor presencia de células memoria con alto potencial para auto-renovarse y diferenciarse (células T madre memoria) correlacionan directamente con una mejor respuesta terapéutica.

Nuestra hipótesis es que es posible mejorar la disponibilidad y la eficacia terapéutica de las células CAR-T mediante edición génica de los linfocitos T y optimizando su manipulación *ex vivo* para generar un alto porcentaje de células T memoria modificadas genéticamente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis es desarrollar una plataforma terapéutica segura y eficiente que permita la generación de células CAR-T universales con mayor persistencia. Para ello se recurrirá a herramientas de edición génica y al uso de moduladores metabólicos. Se perseguirán los siguientes objetivos concretos:

1. Generación y caracterización de células CAR-T anti-CD19 universales.

- 1.1. Optimización de la eficacia y seguridad de la edición génica de células T primarias humanas.
- 1.2. Combinación edición génica y vectores lentivirales para generar células ARI-CAR-T universales.
- 1.3. Estado metabólico de las células TCRKO ARI-CAR-T.
- 1.4. Análisis de la respuesta alogénica de las células TCRKO ARI-CAR-T.
- 1.5. Determinación de la actividad anti-leucémica de las células TCRKO ARI-CAR-T.
- 1.6. Adaptación del protocolo para generar células T TCRKO en un electroporador clínico.

2. Mejora de la actividad antitumoral de las células CAR-T universales mediante intervención metabólica.

- 2.1. Expansión de células T primarias en presencia de moduladores metabólicos.
- 2.2. Tratamiento de las células TCRKO ARI-CAR-T con los moduladores metabólicos.
- 2.3. Efecto de los moduladores metabólicos en la actividad antitumoral de las células TCRKO ARI-CAR-T.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

1.1. Líneas celulares humanas

Las líneas Namalwa (linfoma de Burkitt, ATCC® CRL-1432) y Jurkat (leucemia aguda de células T humanas, ATCC® TIB428 152) fueron expandidas en medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowest) y 1% de Penicilina/Estreptomina (P/S, Biowest) en una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂. Las líneas HEK-293T (células embrionarias humanas procedentes de riñón embrionario, ATCC® CRL-11268,) y MiaPaCa2 (carcinoma de páncreas, ATCC® CRL-1420™) fueron cultivadas en DMEM (Biowest) suplementado con 10% FBS y 1% PS a 37°C y 10% o 5% de CO₂, respectivamente. Las células Namalwa y Namalwa CD19KO expresando la proteína verde fluorescente eGFP y nanoluciferasa (NLuc) fueron generadas previamente en el laboratorio, así como las células MiaPaca CD19 eGFP-NLuc (Tristán-Manzano et al., 2022). Todas las líneas fueron mantenidas a la densidad celular indicada por las instrucciones de la ATCC y testadas para micoplasma usando el kit *MycoAlert Mycoplasma Detection* (Lonza).

1.2. Células T primarias humanas

Las alícuotas de productos de aféresis de donantes sanos se obtuvieron bajo consentimiento informado en el hospital Reina Sofía (Córdoba, España). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *Peripheral blood mononuclear cells*) fueron aisladas mediante gradiente en Ficoll (Lymphosep, Biowest) y congeladas. Posteriormente, las PBMCs fueron descongeladas y cultivadas en medio TexMACs (un medio optimizado para el cultivo de células T sin suero, con albúmina sérica humana, glutamina estable y fenol rojo, Miltenyi Biotec) suplementado con 20 ng/ml de IL-2 (Miltenyi Biotec) o 10 ng/ml de IL-7 y 10 ng/ml de IL-15 (Miltenyi Biotec), 5% de suero humano AB y 1% P/S (Biowest) a una densidad de 2×10^6 células/ml, a 37°C, 5% CO₂. Al

día siguiente las células fueron activadas con *T cell TransAct* (una nanomatriz anti-CD3/anti-CD28, Miltenyi Biotec). Tras la activación se realizaron pases cada 2 o 3 días manteniendo la densidad celular de 1×10^6 células/ml. Para los experimentos de intervención metabólica, las PBMCs fueron activadas en presencia de 25 μ M de UK5099 (inhibidor del transportador mitocondrial de piruvato, Selleckchem), 5 μ M de AG221 (inhibidor de la isocitrato deshidrogenasa tipo 2, Selleckchem) o 200 nM de CAL-101 (inhibidor de PI3K δ , Selleckchem). Como control negativo, las PBMCs fueron cultivadas en el disolvente, dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Para los experimentos realizados durante la estancia, las PBMCs fueron cultivadas en medio RPMI (Biowest) suplementado con 8% de suero humano y 150 U/ml de IL-2 (PeproTech) y activados con bolitas α CD3/CD28 (Dynabeads, ThermoFisher). Bajo todas las condiciones, tras 7-9 días de cultivo la población de células T era superior al 90%.

2. VECTORES LENTIVIRALES

VL-ARI-0001

Vector lentiviral de tercera generación que expresa un CAR α -CD19 bajo el control del promotor hEF1 α , cedido por el Dr. Manel Juan Otero y la Dra. Castella (Castella et al., 2019).

3. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES Y TITULACIÓN

3.1. Transfección

Previamente se realizó una maxiprep usando el kit *NucleoBond Xtra Maxi EF* (Macherey-Nagel). Se corroboró la pureza del producto mediante absorbancia y digestión con HindIII. Para la generación de vectores lentivirales, las células HEK-293T fueron sembradas en placas de 10 cm (Sarsted, Newton, NC) con una confluencia menor del 90% y transfectadas mediante un sistema de segunda generación basado en tres plásmidos: (1) Plásmido-vector; (2) Plásmido empaquetador del

virus VIH (pCMV Δ R8.9) (http://www.addgene.org/Didier_Trono), y (3) Plásmido de la envuelta VSV-G (pMD2.G) (http://www.addgene.org/Didier_Trono), en proporción 10:7:3 usando como reactivo de transfección polyethylenimine (PEI, Alfa Aesar). A las 5 h se realizó un cambio de medio para evitar la toxicidad de VSV-G.

3.2. Recogida y concentración

Los sobrenadantes virales fueron recogidos a 30, 48 y 72 h tras la transfección, filtrados con filtros de 0,45 μ m (Nalgen). La concentración de las partículas virales recogidas se realizó mediante ultracentrifugación usando el rotor SW 32 Ti (Beckman) a 23 000 rpm durante 2 h a 4°C. Los virus fueron alicuoteados y almacenados a -80°C.

3.3. Titulación de los vectores

Los títulos virales se determinaron a través del cálculo de partículas eficientes (unidades de transducción por mililitro; UT/ml) por citometría de flujo. Para ello, se utilizaron células fáciles de transducir (células Jurkat), se plaquearon 10^5 células por pocillo en una placa de 48 pocillos y se cultivaron con diferentes cantidades de sobrenadantes virales sin concentrar y concentrados durante 5 h. A los 3-4 días, se determinó el porcentaje de células positivas en el citómetro. Las UT/ml fueron calculadas relacionando el porcentaje de células transducidas con el volumen de virus usado en rango lineal, siguiendo la siguiente fórmula: %células positivas $\times 10^5$ / Volumen sobrenadante viral (ml), asumiendo que las células contienen una única copia del vector (para ello el porcentaje de transducción debe ser menor del 30%). A partir del título se puede calcular la multiplicidad de infección (MOI), aplicando la fórmula: MOI = UT/ml \times Volumen sobrenadante viral (ml) / n° células transducidas.

4. TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL Y ELECTROPORACIÓN

Las PBMCs activadas con la nanomatriz anti-CD3/anti-CD28 durante 48 h fueron transducidas con las partículas virales a MOI=10 mediante

espinoculación (800g durante 60 min a 32°C). Tras 5 horas, las células fueron lavadas a 300g durante 5 min y sembradas en medio TexMACs suplementado a una densidad 1×10^6 células/ml. Dos o tres días después, las células fueron editadas con CRISPR/Cas9. Para ello, en primer lugar se formaron los complejos de ribonucleopartículas (RNPs) incubando 3,3 μ M de Cas9 como proteína (IDT) con 10 μ M del ARN guía dirigido al primer exón del locus *TRAC* (ARNg_{TRAC}: ucaggguucuggauaucugu, GenScript) en un ratio 1:3 durante 15 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se determinó la densidad celular y la cantidad requerida de células fue lavada una vez con PBS y una segunda vez con el buffer de electroporación (medio Opti-MEM, ThermoFisher). Todas las centrifugaciones se realizaron a 300g durante 5 min a temperatura ambiente. Las células fueron resuspendidas en la solución conteniendo las RNPs y se añadió Opti-MEM hasta alcanzar el volumen final de la cubeta de nucleofección (20 o 100 μ l, Lonza). La mezcla fue electroporada usando el 4D-Nucleofector (Lonza) y el programa EO-115. Durante la estancia se usó el electroporador Nepa21 (Nepagene). Las células fueron recuperadas en medio TexMACs sin suplementar a 37°C y sembradas a una concentración de 2×10^6 células/ml (teniendo en cuenta que tras la electroporación la viabilidad es del 50%). Después de 5 horas, las células fueron diluidas a 1×10^6 células/ml añadiendo medio TexMACs suplementado al 2x. Tras 48 h-72 h las células se lavaron en caso de que fuera necesario y se cultivaron a 1×10^6 células/ml en medio completo. Siete días tras la transducción, el porcentaje de células transducidas y editadas, junto con la caracterización fenotípica, fue determinado mediante citometría de flujo. La eficiencia de edición fue corroborada por secuenciación (ver abajo).

Para los experimentos de seguridad de edición las PBMCs fueron activadas y editadas (día 4, D4) o fueron activadas, mantenidas en cultivo y editadas (día 17, D17).

5. CÁLCULO DEL NÚMERO DE COPIAS DEL VECTOR POR CÉLULA (N.C.V.) POR PCR DIGITAL (dPCR)

Para obtener el cálculo de número de copias del vector por células las células transducidas fueron lisadas a los 7-10 días y se extrajo el ADN genómico (ADNg) haciendo uso del kit comercial *QiAamp DNA Mini* (Qiagen). Para la dPCR se utilizó la *ddPCR supermix for probes* (no dUTP) (BIO-RAD) y oligonucleótidos y sondas dirigidas a la secuencia Psi del vector (LVPSIFw-CAGGACTCGGCTTGCTGAAG; LVPSIRv-TCCCCGCTTAATACTGACG; LVPSIPRB-/56 FAM/CGCACGGCAAGAGGCGAGG/3IABkFQ/) y al gen GAPDH (GAPDHFw-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC; GAPDHRv-TGGTACATGACAAGGTGCGG; GAPDHPRB-/5HEX/CCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACA/3IABkFQ/). Como control se usó ADNg con una sola copia de vector (obtenido de un modelo generado previamente en el laboratorio). Se depositaron 22 ng de ADNg de cada muestra por duplicado. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el sistema C1000 Touch (BIO-RAD) usando el programa: 1x (25°C, 1 min); 1x (95°C, 10 min); 40x (97°C, 15 seg; 61°C, 45 seg). Finalmente, la cuantificación de las gotas se llevó a cabo en el equipo QX 200 Droplet Reader (BIO-RAD) y los resultados fueron analizados en el programa QuantaSoft.

6. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES GENERADAS

6.1. Análisis en la secuencia diana (*on-target*)

Una alícuota de células no editadas (WT) y editadas a los diferentes días (TCRKO D4 y TCRKO D17) fueron lisadas a los 5-7 días tras la edición y se extrajo el ADNg usando el kit comercial *QIAamp genomic DNA* (Quiagen). La reacción se llevó a cabo usando KAPA2G Fast Hot Start Ready Mix (Sigma-Aldrich), 10 ng de ADNg y la pareja de oligonucleótidos 1 (**Tabla 5**). Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en el termociclador Veriti (ThermoFisher) usando el programa: 1x (95°C, 5min); 40x (94°C, 45 seg / 60°C, 15 seg/ 72°C, 30

seg); 1x (72°C, 10 min). Para la secuenciación Sanger, los productos de PCR fueron amplificados usando el kit *QIAquick PCR Purification* (Quiagen). Las secuencias fueron analizadas usando el programa ICE (<https://ice.synthego.com/>), el cual nos aporta la eficiencia de edición y la distribución de los *indels* (inserciones/delecciones).

6.2. Análisis fuera de la secuencia diana (*off-target*)

La herramienta Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) fue empleada para la predicción *in silico* de los posibles *off-targets* del guía ARNg_{TRAC}. Se seleccionaron seis posibles sitios, los cuales fueron analizados en el ADNg de células editadas y no editadas por secuenciación Sanger y usando el software ICE. La secuencia oligonucleótidos usados aparece en la **tabla 5**.

6.3. Secuenciación masiva

Partiendo de ADNg de células editadas y no editadas se amplificó 532p pb alrededor del punto de corte del ARNg_{TRAC} (pareja 1, **tabla 5**). Los amplicones generados se secuenciaron usando el equipo MiSeq™ (Illumina). Se recortaron los adaptadores usando *Cutadapt* (<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>) para oligonucleótidos universales de Illumina y el control de calidad fue realizado usando *fastqc* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para el alineamiento al genoma de referencia (hg38) se usó *bwamem*. Las secuencias alineadas fueron convertidas a un formato BAM, ordenadas e indexadas usando *Samtools* (Li et al., 2009), de manera que podían ser visualizadas usando la herramienta IGV (Robinson et al., 2011). La frecuencia de *indels* fue obtenida usando la herramienta online Cas-Analyzer (CRISPR RGEN Tools, <http://www.rgenome.net/casalyzer/>) (Park et al., 2017).

6.4. Análisis de largas delecciones por PCR

Se amplificó una región de 4 kb alrededor del punto de corte usando los oligonucleótidos Fw8 y Rv8 (pareja 8, **Tabla 5**) y 50 ng de ADNg.

Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en el termociclador Veriti (ThermoFisher) usando el programa: 1x (95°C, 3 min); 40x (94°C, 15 seg / 62°C, 2.5 min/ 72°C, 3 min); 1x (72°C, 10 min). Los productos de PCR se cargaron en un gel 1% de agarosa y el gel se reveló en el sistema Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad) y las imágenes se analizaron usando el programa Image Lab (Bio-Rad).

6.5. Aislamiento y caracterización de largas deleciones

Una de las calles del gel, en concreto la muestra del donante 3 a día 4, fue recortada y el ADN fue extraído usando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) y clonado en un plásmido PCR2.1. Se transformaron bacterias competentes (*E.Coli*, Stable3) y fueron sembradas en placas de agar LB conteniendo X-Gal/IPTG (para permitir el rastreo de colonias azules y blancas) y 50 µg/mL de ampicilina. Tras la incubación toda la noche a 37°C, se picaron 40 colonias blancas (conteniendo los insertos) y fueron resuspendidas en agua. El ADN plasmídico fue extraído usando el kit *Plasmid DNA Miniprep* (Quiagen) de 20 clones diferentes. Todas las secuencias obtenidas fueron alineadas al genoma de referencia (hg38) usando UCSC BLAT (Kent, 2002) y visualizadas usando IGV (Robinson et al., 2011). La presencia de elementos repetitivos fue evaluada usando UCSC RepeatMasker (Tarailo-Graovac & Chen, 2009). Los fragmentos entre las secuencias alineadas permitieron la identificación de largas deleciones. La presencia de microhomologías fueron analizadas usando el paquete "Biostring" y un comando en R desarrollado por Owens y cols., (Owens et al., 2019). Este comando usa 10 pb aguas arriba y aguas abajo de los puntos de corte de cada deleción para identificar cada microhomología.

	FW (5' A 3')	RV (5' A 3')
PAREJA-1	TCTGCCAGAGTTATAATTGCTG	TTGAAGTCCATAGACCTCATGTC
PAREJA-8	CTCTGAGAGGGGTCATCCCA	GGCAGCGAGGCATACATAGT
OT-1	AGCAGACATTTGGTTTGTGGG	AGCTGATACCTTGCACTCTCC
OT-2	GCACTTTCCAATGTGGCCG	ACAGCCTGCCTCAATGTTGT
OT-3	CTCTGAATCCCACAACCCTGA	AGCCATCCTTCCCATCTGTT

OT-4	TCCACAACGGATTGTCCAG	CCAGCTTACTGCCTGAGGT
OT-5	ACCCATGCAATGTGCTTAACAT	CTCCCCCTGCTATGTGTTCA
OT-6	GACCAATACAGGGGCTGCTT	CCATTTGCATGCACAACCCA

Tabla 5. Descripción y secuencia de los oligonucleótidos usados en el análisis mutagénico.

7. CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)

La expresión del CAR α -CD19 se determinó usando el anticuerpo primario IgG1 de cabra dirigido a la región Fab murina conjugado a biotina (Jackson Immunoresearch), y estreptavidina (APC, Thermo Fisher) como anticuerpo secundario. Aproximadamente 50 000 células fueron lavadas con *buffer* de lavado para CF (PBS+3% BSA+2mM EDTA) e incubadas con el anticuerpo anti-Fab murino (1:100) durante 40 min. Tras un lavado con el *buffer* para CF, se añadió la estreptavidina-APC (1:330). Pasados 15 min se realizó la tinción extracelular para el marcaje fenotípico durante 15 minutos. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS dos veces. Para la caracterización fenotípica de las células T se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales de superficie: hCD62L-PE-Cy7/PerCP-Cy5.5 (1:200), hCD45RA-PE/FITC/BUV395 (1:200), hCD45RO-PE/FITC/BUV805 (1:200), hCD3-PerCP-Cy5.5/APC-780/BV711 (1:200), hCD2-PerCP-Cy5/APC-780 (1:200), hCD4-eFluor450/PeCy7/AlexaFluor532 (1:200), hCD8-eFluor450/PeCy7/BV421 (1:200), hTIM3-APC-Cy7/PE-CF594 (1:100), hLAG3-PE/eFluor506/AlexaFluor700 (1:100), hPD1-APC/PE/APC-Cy7 (1:100), hCD39-FITC (1:100), hCD95-PE (1:100), hCCR7-Pacific Blue (1:100), hCD27-BV605 (1:100) y hCD28-PE-Cy7 (1:100) de eBioscience (ThermoFisher) y Biolegend. Las subpoblaciones de células T se definieron usando los marcadores CD45RA y CD62L: T *naïve*/T madre memoria (T_N/T_{SCM}): CD45RA+CD62L+; T memoria central (T_{CM}): CD45RA-CD62L+; T memoria efectora (T_{EM}): CD45RA-CD62L-, y T efectora (T_{EF}): CD45RA+CD62L-. También se usó un panel más extenso para marcar a las células T_{SCM} : CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD45RO- CD95+ CD28+ CD27+, y a las células T_{CM} : CD45RA- CD62L+ CCR7+ CD45RO+ CD95+ CD28+ CD27+.

Para analizar la actividad mitocondrial, las células fueron incubadas con éster metílico tetrametilrodamina (TMRM, ThermoFisher) y *MitoTracker Green* (MG, ThermoFisher) a 37°C durante 20 min en RPMI sin rojo fenol (ThermoFisher).

Para las muestras de ratón, previamente a la tinción, los receptores Fcγ fueron bloqueados usando el anticuerpo anti-CD16/CD32 murino (1:100, ThermoFisher), *FcR blocking* (1:150, Miltenyi) y 5% de suero de ratón (Sigma Aldrich) durante 20 min. Posteriormente, las células fueron lavadas con el *buffer* para CF y se procedió a la tinción para determinar el CAR combinada con la tinción extracelular. Para el marcaje de la muerte celular se utilizó el colorante de viabilidad DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Beckman Coulter).

Todas las tinciones se realizaron en hielo y en oscuridad y los lavados a 400g durante 5 min.

Para el recuento absoluto de células se usaron las bolitas CountBright para citometría de flujo (ThermoFisher).

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II, BD FACSVerse, BD LSR II (BD Biosciences), o Cytex Aurora (Cytex), y los datos fueron analizados usando el programa FlowJo (TreeStar) en la ventana apropiada tras la eliminación de dobletes y células muertas. Las muestras se excluyeron de los análisis de citometría de flujo cuando se registraron menos de 20 eventos en la población celular de interés, ya que no permite una evaluación fenotípica precisa, excepto cuando se trataba de la cuantificación absoluta de esa población celular de interés.

8. ENSAYOS FUNCIONALES

8.1. Respuesta a antígenos alogénicos

Para evaluar la respuesta de las células T editadas para el TCR a aloantígenos, las células WT y TCRKO ARI en reposo fueron lavadas y mantenidas en medio TexMACs sin suplementar durante 24 h. Pasado

este tiempo las células T fueron marcadas con *Cell Trace Violet* (CTV, ThermoFisher). Brevemente, la cantidad deseada de células fue resuspendida en PBS conteniendo CTV a una concentración de 5 μM y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después las células fueron lavadas tres veces con RPMI suplementado con FBS. Se determinó la densidad celular y se co-cultivaron con PBMCs (deplecionadas para células CD19+) del mismo donante o de un donante diferente a un ratio 1:5 efector:diana (E:D). A los seis días se determinó la proliferación de las células efectoras (CD3+CAR+/CD3-CAR+) por citometría de flujo (midiendo la pérdida de tinción de CTV).

8.2. Proliferación

Para el estudio de la capacidad proliferativa de las células T tras 9 días en presencia de los inhibidores, las células fueron teñidas previamente a la activación con el compuesto fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, ThermoFisher) siguiendo el mismo protocolo descrito para la tinción con CTV y activadas vía CD3/CD28. La proliferación celular se determinó midiendo la pérdida de CFSE por citometría de flujo.

8.3. Citotoxicidad

La capacidad citotóxica de las células CAR-T αCD19 fue determinada mediante cocultivo secuencial con células CD19+. En concreto se usó la línea Namalwa, de linfoma de Burkitt y la línea MiaPaca CD19+, de carcinoma pancreático, modificada con vectores lentivirales para expresar constitutivamente CD19 (60-70% CD19+, (Tristan-Manzano et al., 2022)). Ambas líneas expresaban de forma constitutiva eGFP-NLuc (100% eGFP+). Como control negativo se utilizaron las líneas Namalwa eGFP-NLuc CD19KO, generada previamente en el laboratorio mediante el sistema CRISPR/Cas9 y la línea MiaPaca eGFP-NLuc. Fueron cocultivadas en varias réplicas a los ratios efector:diana (células CAR-T:células CD19+, E:D) indicados partiendo de 2×10^4 células Namalwa en una placa de 96 en U, o de $7,5 \times 10^3$ células MiaPaca en una placa de 96 de fondo plano (sembradas 3 o 4h antes para permitir su adherencia)

en medio TexMACs no suplementado. Tras 24h o 48h se determinó el conteo absoluto de células diana y efectoras, así como el fenotipo de las células T mediante citometría de flujo. Nuevas células Namalwa fueron añadidas a cada réplica cuando >80% de las células tumorales fueron lisadas, para ello se descartó la mitad del volumen del pocillo. En el caso del cocultivo con MiaPaca, las células T fueron transferidas a una nueva placa conteniendo las células tumorales adheridas cuando la lisis específica fue mayor del 10%.

La lisis específica (%) para las células Namalwa se calculó usando la fórmula:

$$1 - \left(\frac{\frac{\%CD19 + (con\ CAR+)}{\%CD19 - (con\ CAR+)}}{\frac{\%CD19 + (con\ CAR-)}{\%CD19 - (con\ CAR-)}} \right) \times 100$$

En el caso de las células MiaPaca, la lisis específica tras cada encuentro fue calculada como: $(1 - (\text{N}^\circ \text{CD19+ en presencia de CAR} / \text{N}^\circ \text{CD19+ en ausencia de CAR})) \times 100$.

A las 24 h de cocultivo los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -80°C. Los niveles de TNF α y IFN γ en los sobrenadantes se midieron usando el kit *ELISA MAX Deluxe Set* (Biolegend, San Diego, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9. MODELO ANIMAL Y ANÁLISIS POR BIOLUMINISCENCIA

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada (92-CEEA-OH2015), en concordancia con la ley Europea (ETS 123 – Protection of Vertebrate Animals, 18.III.1986) y española (R.D. 53/2013).

Ratones NOD/scid-IL-2Rnull (NSG, The Jackson Laboratory), de seis a ocho semanas de edad fueron inoculados intravenosamente (i.v.) con 3×10^5 Namalwa eGFP-NLuc células por ratón. Tres días después se

determinó la dispersión tumoral por bioluminiscencia y los ratones fueron homogéneamente repartidos en los diferentes grupos e inoculados intravenosamente con: células CAR-T (50%CAR+, 2×10^6 células CAR-T/ratón), células T no transducidas (NT, 4×10^6) o vehículo (PBS). Las células T habían sido expandidas previamente *in vitro* durante 10 días y congeladas en nitrógeno líquido. La progresión tumoral fue determinada dos veces en semana por bioluminiscencia (BLI). Para ello el reactivo de la nanoluciferasa (fumirazina, Nano-Glo, Promega) fue diluido en PBS (1/60) e inyectado intraperitonealmente a los ratones previamente a la adquisición en un analizador de espectro IVIS (Caliper, Perkin Elmer). Las imágenes se adquirieron durante 180 segundos, en campo abierto, y se analizaron utilizando Living Image 3.2 (Perkin Elmer) o AURA Imaging Software 3.2 (Spectral Instruments Imaging). Los ratones fueron monitorizados para signos de enfermedad de injerto contra huésped, como pérdida de peso, movilidad reducida, postura encorvada, taquipnea o pérdida de pelo. Los ratones que sobrevivieron un mes tras la inducción de la enfermedad recibieron una segunda dosis de células Namalwa eGFP-NLuc. Los ratones que presentaron una pérdida de peso superior al 20% o valores de BLI superiores a 5×10^7 Fotonos/seg fueron sacrificados.

Tras el sacrificio, muestras de sangre, médula ósea, cerebro, hígado y bazo fueron analizadas para la presencia de células Namalwa y células T/CAR-T humanas por CF. La suspensión de células del hígado y bazo fue obtenida por interrupción mecánica, de la médula ósea por perfusión del fémur y tibia, y del cerebro por interrupción mecánica seguida por separación en gradiente de Percoll. La sangre fue extraída de la vena aorta y diluida en EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético).

10. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA

Tras 10 días de la estimulación con α -CD3/CD28, la función mitocondrial de las células CAR-T fue analizada a través de diferentes parámetros metabólicos determinados usando el equipo Agilent Seahorse XF HS Mini Analyzer y el kit comercial *T cell metabolic profiling* (Agilent

Technologies). Las células CAR-T fueron lavadas, contadas y resuspendidas en medio XF RPMI, conteniendo 10 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina, y 1 mM de piruvato sódico. 1×10^5 de células fueron sembradas por pocillo en las miniplacas XFp PDL. Durante la calibración del instrumento las células fueron mantenidas a 37°C en un incubador sin CO₂. Las tasas de consumo de oxígeno (OCRs, del inglés *oxygen consumption rates*) y de acidificación extracelular (ECARs, del inglés *extracellular acidification rates*) fueron medidas en condiciones basales y tras el tratamiento con 1.5 μM de oligomycina A (inhibidor de la ATP sintasa), 2.5 μM de BAM15 (desacoplador mitocondrial), y 0.5 μM rotenona con 0.5 μM antimicina A (inhibidor mitocondrial) (Agilent Technologies). Los resultados fueron analizados usando el programa Seahorse Analytics (<https://seahorseanalytics.agilent.com/>).

10.1. Algunos conceptos metabólicos

- **Tasa de producción de ATPmito:** es la tasa de producción de ATP (pmol/min) asociada a la fosforilación oxidativa en la mitocondria.
- **Tasa de producción de ATPgluco:** es la tasa de producción de ATP (pmol/min) asociada a la conversión de glucosa a lactato a través de la vía glucolítica.
- **Capacidad respiratoria máxima (SRC, del inglés *Spare Respiratory Capacity*):** diferencia entre la máxima señal OCR (medida OCR tras la exposición a un desacoplador) y el OCR basal (medida OCR antes de la primera inyección). El desacoplador mimetiza una demanda de energía fisiológica estimulando a la cadena respiratoria para trabajar a máxima capacidad. Por tanto, esta medida indica el potencial de una célula para responder a una alta demanda energética. Este parámetro puede ser un indicador del estado celular y su capacidad de adaptación.
- **Potencial metabólico (OCR):** (medida máxima de OCR tras la primera inyección/ medida OCR antes de la primera inyección) x 100.

11. ELECTROPORACIÓN CON ExPERT GTx

PMBCs aisladas de diferentes donantes fueron cultivadas en medio TexMACs (Miltenyi Biotec) en presencia de 5% suero humano (Biowest), 1% de p/s (Biowest), 10ng/ml de IL-7 y 10ng/ml de IL-15 (Miltenyi Biotec). Tras 48h de activación con la nanomatriz anti-CD3/CD28 (Miltenyi Biotec), las células fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en el *buffer* de electroporación (Maxcyte) a una concentración de 10^8 células/ml. Para cada condición se usaron 2×10^6 células (20 μ l), estas fueron mezcladas con RNPs ensambladas previamente usando 60 pmol de ARNg y 29,8 pmol de Cas9 (ratio 2:1) o 19,8 pmol de Cas9 (ratio 3:1). Cada condición a ser electroporada se depositó en una cubeta de nucleofección tipo OC25x3, la cual fue introducida en el electroporador ExPERT GTx (Maxcyte) y se ejecutó el programa *Expanded T cell 3*. Las células de cada condición fueron sembradas en 1ml de medio TexMACs sin suplementar en una placa de 12. A las 4h se añadió a cada pocillo 1 ml de TexMACs suplementado con 10% de suero humano y 20 ng/ml de IL-7 e IL-15, sin antibiótico. Se usaron como controles células no electroporadas y células electroporadas con Cas9.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa Prism 9 software (GraphPad Software Inc., La Jolla). Los ensayos estadísticos realizados son indicados en la leyenda de cada figura. Los datos son representados como la media \pm error estándar de la media (SEM). Brevemente, las comparaciones para dos grupos se calcularon utilizando Student's T test. Las comparaciones de más de dos grupos se calcularon utilizando one-way ANOVA. Las comparaciones de datos agrupados se calcularon utilizando two-way ANOVA. Las curvas de supervivencia fueron obtenidas usando el análisis de Kaplan–Meier.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CAR-T ANTI-CD19 UNIVERSALES

1.1. Optimización de la eficacia y seguridad de la edición génica de células T primarias humanas

1.1.1. Eficacia

La traslación a clínica de las células CAR-T alogénicas requiere de un protocolo altamente eficiente y seguro para generar productos universales. La estrategia más seguida por los investigadores y clínicos consiste en la eliminación del TCR mediante el uso de herramientas de edición genómica. En base a la literatura, elegimos el sistema CRISPR/Cas9 como método de edición genómica. Este fue entregado en forma de ribonucleoproteína (RNP), formada tras el alineamiento del ARNg con la proteína Cas9 recombinante, y mediante electroporación. Se seleccionó un guía de la literatura dirigido frente al exón 1 del locus *TRAC* (ARNg_{TRAC}) (Eyquem et al., 2017) (**Figura 11A**). En primer lugar, se llevó a cabo una optimización del ratio y concentración de ARNg y Cas9 utilizando PBMCs tras 4 días desde su aislamiento (D4). La eficacia de EG fue determinada por citometría de flujo, mediante tinción de CD3 (**Figura 11B**). Los mejores resultados (sobre un 90% de TCRKO) se obtuvieron con un ratio ARNg/Cas9 de 3:1, usando 200 pmol de ARNg y 67 pmol de Cas9 por cada 800 000 de células T primarias. Dado que estas concentraciones habían saturado el sistema (250/83 de ARNg/Cas9 no mejoraba la edición, ver **Figura 11B**, gráfica derecha), se realizó otro experimento reduciendo las concentraciones, pero manteniendo la proporción 3:1 (**Figura 11C**). Además se utilizaron PBMCs a diferentes días de cultivo (D4 y D17), con la finalidad de determinar el momento óptimo para EG. Los resultados mostraron que si reducimos la cantidad de ARNg/Cas9 por debajo de 200/67 pmol se reduce la eficiencia de EG casi a la mitad bajo estas condiciones. Además, en condiciones óptimas, la eficacia es similar a D4 o D17 (cerca al

90%), aunque a menores concentraciones se observa que las células T son más permisivas a la EG tras 17 días de cultivo/expansión como muestran los gráficos de puntos de arriba-derecha (D4) frente a los de abajo-derecha (D17) en la **Figura 11C**.

En base a estos resultados, establecimos la edición a tiempos cortos de expansión usando 200 pmol de guía y 67 pmol de Cas9 como el protocolo estándar. Se procedió a analizar posibles diferencias entre las poblaciones CD4 y CD8, así como la estabilidad de la población editada. La eficiencia de disrupción del TCR fue equivalente en células T CD8+ y CD4+ (**Figura 11D**). La población editada fue estable en el tiempo, manteniendo su capacidad proliferativa hasta 4 semanas (**Figura 11E**).

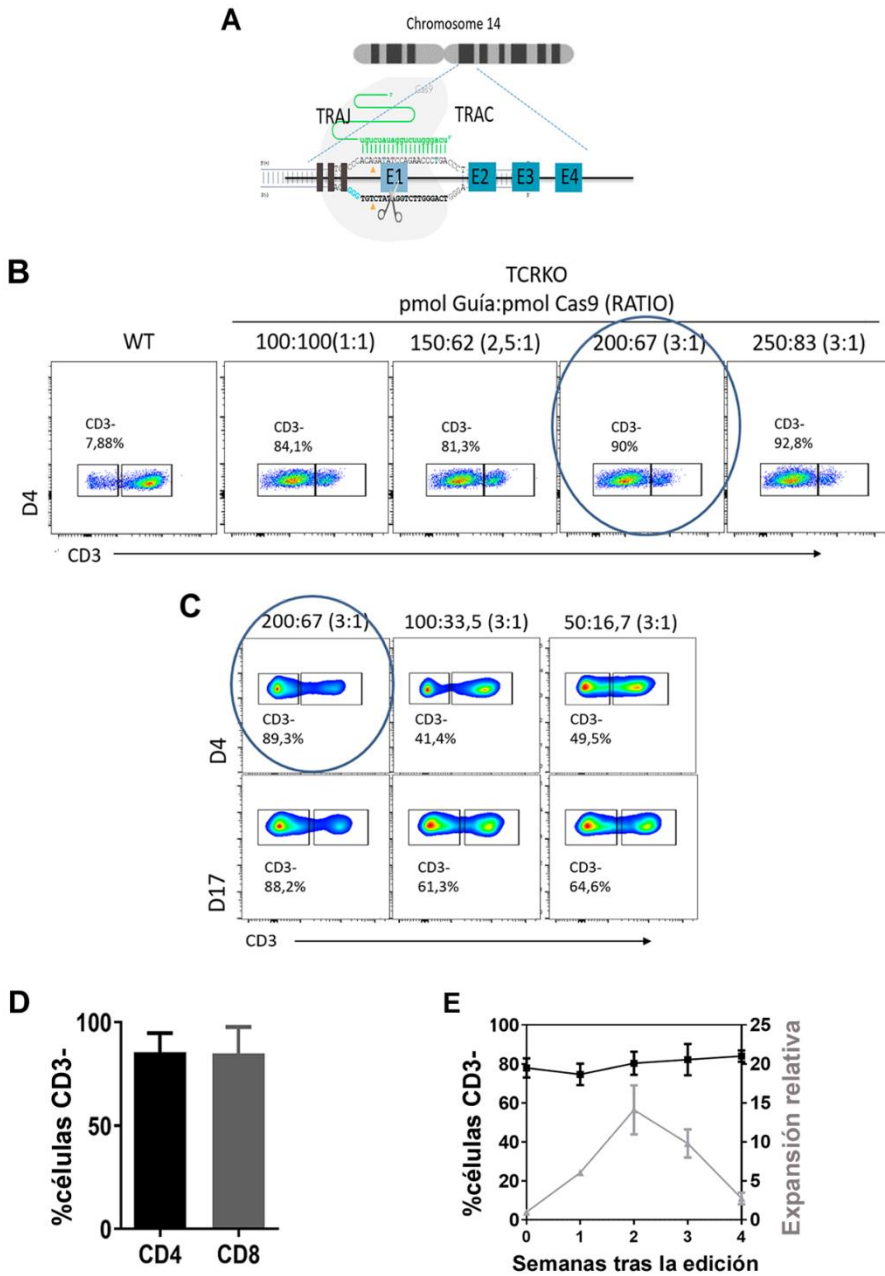


Figura 11. Generación de células T TCRKO mediante electroporación de CRISPR/Cas9 como RNP (RNP_{TRAC}). (A) Diagrama del sistema CRISPR/Cas9 compuesto de un guía de ARN dirigido al exón 1 del locus *TRAC* y la proteína Cas9 recombinante (RNP_{TRAC}). (B) Análisis mediante CF de la pérdida de expresión de CD3 en PBMCs electroporadas con diferentes ratios de ARNg y Cas9 a día 4 en cultivo (D4). El porcentaje de células CD3- obtenido en cada condición aparece en cada gráfico de puntos. (C) Gráficos de citometría indicando la expresión de CD3 en células editadas a tiempos

tempranos (4 días en cultivo, D4) o más tardíos (17 días en cultivo, D17) con cantidades decrecientes de ARNg y Cas9. El porcentaje de células CD3- obtenido en cada condición es indicado en cada gráfico de puntos. **(D)** Gráfica representando el porcentaje de células CD3- dentro de las poblaciones CD4+ y CD8+ (4 donantes independientes, n=8). **(E)** Gráfica que indica el porcentaje de células CD3- tras 4 semanas de la edición (eje Y izquierdo), así como la expansión relativa de las células electroporadas, calculada dividiendo el número de células determinado por conteo manual cada semana entre el número de células sembradas a día 0 (eje Y derecho) (4 donantes independientes, n=4). Las gráficas muestran la media \pm SEM.

La manipulación genética de las células T primarias puede inducir cambios fenotípicos que reduzcan su eficacia antitumoral. Por lo tanto, a continuación, se procedió a analizar el fenotipo de las células T CD8+ (células efectoras antitumorales) 10 días después de la edición. Como control se usaron PBMCs electroporadas solo con Cas9 (células WT) para eliminar así las diferencias debidas al proceso de electroporación. Usamos los marcadores CD45RA+ y CD62L+ para identificar las diferentes subpoblaciones de células T, siendo las células T_N/T_{SCM} CD45RA+CD62L+ y las células T_{CM} CD45RA-CD62L+ (**Figura 12A**). Como marcadores de agotamiento usamos CD39, TIM3, LAG3 y PD1 (**Figura 12B**). También diferenciamos entre distintos grados de agotamiento en función de la expresión de 0, 1, 2 o 3 receptores inhibidores (**Figura 12C**). Interesantemente, no encontramos diferencias significativas entre células CD8+ editadas y no editadas, salvo una menor expresión de PD1 en las células TCRKO (**Figura 12B**).

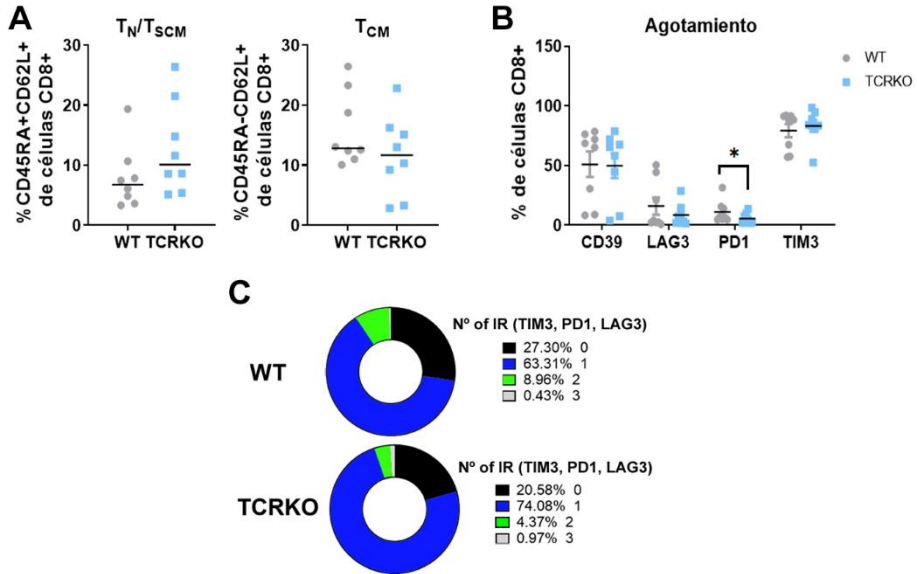


Figura 12. Fenotipo de las células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9 (RNP_{TRAC}). Tras 10 días de edición se analizaron diferentes marcadores de las células T mediante CF. **(A)** Porcentaje de células T_N/T_{SCM} (CD45RA+CD62L+, gráfica izquierda) y células T_{CM} (CD45RA-CD62L+, gráfica derecha) dentro de la población CD8+ de células electroporadas con Cas9 (WT) y RNP_{TRAC} (TCRKO). **(B)** Porcentaje de células CD39+, LAG3+, PD1+ y TIM3+ de células CD8+ WT y TCRKO. **(C)** Gráficos representativos del porcentaje de expresión de 0 (negro), 1 (azul), 2 (verde) y 3 (gris) marcadores de agotamiento/receptores inhibidores (RI) (TIM3, PD1 y LAG3) en células CD8+ WT (arriba) y TCRKO (abajo). Las gráficas muestran la media ± SEM (7 donantes independientes, n=8). La estadística se basa en un Student's t-test pareado de dos colas, *p<0,05.

Dado que el fenotipo de las células T se correlaciona con su estado metabólico, se analizó además el estado mitocondrial de las células T editadas. Para ello usamos éster metílico tetrametilrodamina, (TMRM) para medir el potencial de membrana mitocondrial y *MitoTracker Green* (MG) para cuantificar la masa mitocondrial total. Según la tinción de ambos marcadores, dividimos a la población de células CD8+ en células con mitocondrias disfuncionales (MG+TMRM-), energéticas (MG+TMRM+) y de bajo potencial (MG-TMRM-) (**Figura 13A**). La eliminación del TCR aumentó el porcentaje de mitocondrias energéticas, mientras que redujo el porcentaje de mitocondrias disfuncionales (**Figura 13B**). En conjunto, estos datos indican que las células T TCRKO no presentan una desventaja funcional en comparación con las células T WT.

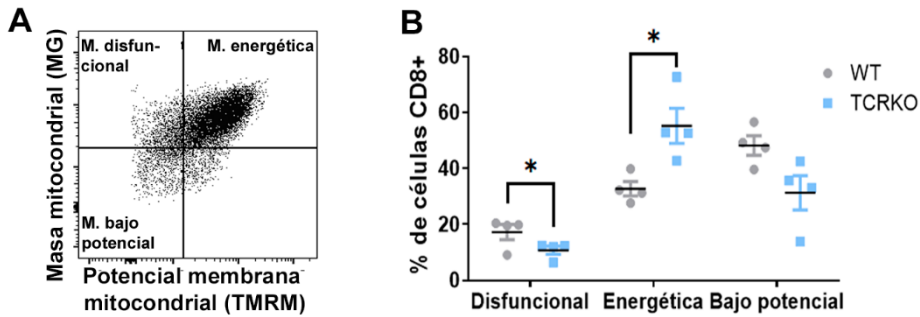


Figura 13. Análisis del estado mitocondrial de las células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9 (RNP_{TRAC}). A los 10 días de edición de las PMBCs, se estudió el potencial de membrana mitocondrial (MTRM) y la masa mitocondrial (MG) de las células T mediante CF. **(A)** Gráfico de puntos representado MTRM frente MG para diferenciar entre mitocondrias disfuncionales (MG+TMRM-), energéticas (MG+TMRM+) y mitocondrias con bajo potencial (MG-TMRM-). **(B)** Porcentaje de células con mitocondrias disfuncionales, energéticas y con bajo potencial dentro de las células CD8+ WT y TCRKO. Las gráficas muestran la media \pm SEM (4 donantes independientes, n=4). La estadística se basa en un Student's t-test pareado de dos colas, *p<0,05.

1.1.2.Seguridad

La tecnología CRISPR/Cas9 ha sido relacionada con la generación de inserciones y/o deleciones (*indels*) no solo en la secuencia diana, sino también fuera, lo que se denomina *off-targets*. Además, puede causar grandes variantes estructurales, como translocaciones o grandes deleciones. Estos fenómenos ocurren como consecuencia de un efecto colateral durante la reparación del DSB generado por la nucleada Cas9 (Liu et al., 2021).

Por otro lado, en la mayoría de los protocolos clínicos la edición de las células T tiene lugar rápidamente tras su obtención del donante. Sin embargo, células T recién aisladas podrían ser más susceptibles de sufrir genotoxicidad indeseada como consecuencia de un genoma más "stem", y, por tanto, con mayor cantidad de euromatina. Por lo tanto, consideramos interesante comparar la seguridad entre editar a tiempos cortos en cultivo (D4) y tiempos largos (D17).

En primer lugar, analizamos diferencias potenciales en la frecuencia de *indels* fuera de diana. Partiendo de células T editadas para el TCR con una eficiencia similar (~90%), observamos que ninguno de los 6 *off-*

targets predichos *in silico* fueron editados ni a D4 ni a D17 mediante análisis por ICE (**Figuras 14A, B**).

Después, analizamos la distribución de los *indels* en el sitio diana en células T de tres donantes sanos diferentes editadas a tiempo corto y largo. La eficacia de edición del genoma en las diferentes muestras fue determinada por secuenciación Sanger, analizada con el programa ICE, (Conant et al., 2022); citometría de flujo, y secuenciación masiva, analizada con el programa Cas-Analyzer (Park et al., 2017). Este triple análisis permitió un análisis más detallado de las deleciones e inserciones (**Figura 14C**). Independientemente del sistema usado para determinar la distribución de los *indels*, las deleciones de 2 nucleótidos (nt) o 1 nt son las modificaciones predominantes en los donantes 1 y 2, mientras que en el 3 predomina una deleción de 32 nt (**Figura 14C**). Esto sugiere que el tipo y frecuencia de los *indels* depende en cierta medida del donante a pesar de usar el mismo sistema y procedimiento.

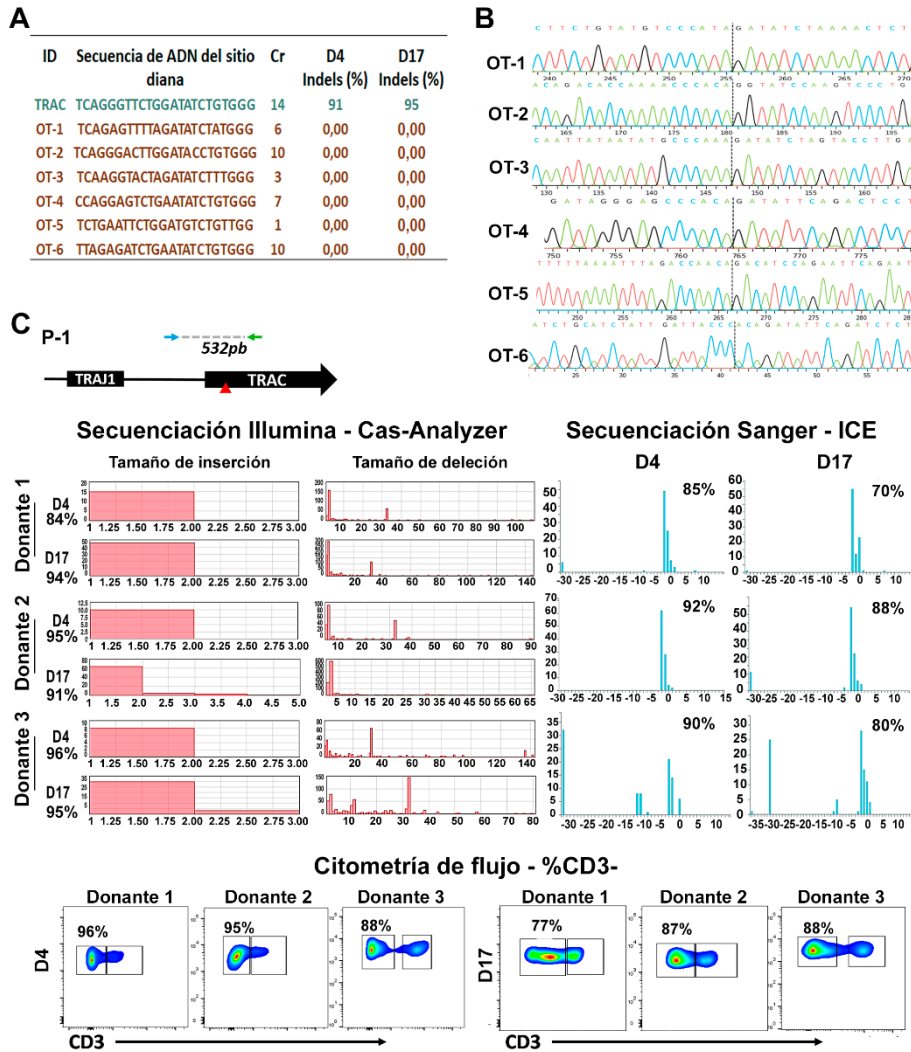


Figura 14. Análisis de *indels* en células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9. (A) Eficacia de corte obtenida con el programa ICE en los 6 sitios *off-targets* predichos más probables tras editar con la RNP_{TRAC} a día 4 y 17. **(B)** Secuencias obtenidas por Sanger para los diferentes *off-targets* de las muestras editadas. La línea de puntos negra representa el punto de corte. **(C)** Arriba, esquema del producto de PCR analizado tras la edición con RNP_{TRAC}. Abajo, análisis de la eficacia de edición con RNP_{TRAC} en células T de 3 donantes diferentes a diferentes días de expansión (D4 y D17) determinada mediante: secuenciación masiva y el programa Cas-Analyzer, por secuenciación Sanger y el programa ICE, y por citometría de flujo. La frecuencia de edición es mostrada para cada una de las condiciones y métodos usados. Además, en el caso de la secuenciación masiva se muestran las gráficas obtenidas con Cas-Analyzer donde se representa el tamaño (eje x) y contaje (eje y) de cada deleción e inserción. Para la secuenciación con Sanger se muestran los gráficos obtenidos por ICE representando el tamaño (eje x) y el porcentaje (eje y) de cada deleción e inserción.

Por último, se analizó la presencia de largas deleciones en el locus *TRAC* tras el corte con la RNP_{TRAC} en células T editadas a los diferentes tiempos, para ello se amplificó por PCR una región de 4 kb alrededor del punto de corte (**Figura 15A**, arriba). Las muestras no editadas (WT) mostraron una única banda de 4kb (que puede presentar diferentes intensidades debido a la variación experimental) correspondiente con el amplicón esperado. Sin embargo, todas las muestras editadas a los diferentes tiempos (D4 y D17) mostraron, además de la banda de 4 kb, la presencia de un patrón de bandas correspondiente con deleciones de diferentes tamaños (**Figura 15A**, abajo). Se procedió a analizar los diferentes amplicones, que correspondían con diferentes deleciones. Para ello el ADN fue extraído de los geles de agarosa y clonado en un plásmido 2.1 como se describe en M&M y se analizaron 20 clones. Un análisis parcial de las bandas amplificadas reveló la presencia de 5 deleciones diferentes de 2 a 3kb. La presencia de microhomologías (2-8 pb) en el punto de ruptura en 4 de las 5 deleciones pone de manifiesto la involucración del mecanismo MMEJ (**Figuras 15B, C**).

Conjuntamente, estos resultados no muestran diferencias sustanciales en el tiempo de edición de las células T respecto a eficiencia y seguridad. No obstante, también destacan la importancia de monitorizar pequeñas y grandes mutaciones tras la edición de células T, ya que podrían convertirse en una importante fuente de inestabilidad genómica.

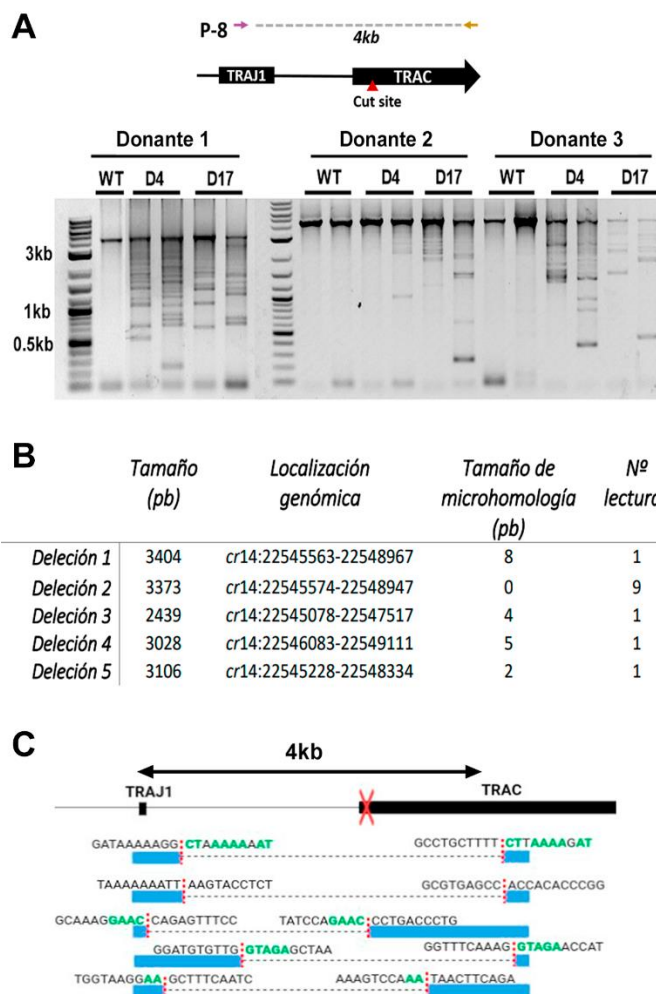


Figura 15. Análisis de grandes deleciones en el sitio de corte en células T editadas con el sistema CRISPR/Cas9. (A) Arriba, esquema del amplicón analizado para detectar grandes deleciones en el locus *TRAC* localizadas 2kb aguas arriba y 2kb aguas abajo del sitio de corte de la RNP_{TRAC}. Abajo, gel de electroforesis del producto de PCR para visualizar la presencia de grandes deleciones. Se realizaron PCRs a partir del ADNg de células T editadas a D4 y D17 de 3 donantes diferentes. Células no editadas (WT) de cada donante fueron usadas como control. (B) Tabla mostrando el análisis de 13 deleciones obtenidas por clonaje del producto de PCR y secuenciación Sanger. Se indica el tamaño de cada deleción, la localización, y la caracterización de microhomologías en el punto de corte. (C) Representación de cinco deleciones secuenciadas y alineadas con el genoma de referencia (hg38). La flecha superior representa el tamaño de amplicón esperado (4 kb). Los recuadros negros representan los loci *TRAC* y *TRAJ1*. La cruz roja representa el sitio de corte CRISPR/Cas9. Los cuadros azules representan el amplicón alrededor de la deleción, representada como una línea de puntos. Se representan las secuencias de ADN en los puntos de ruptura de cada deleción y las bases verdes muestran las microhomologías.

1.2. Combinación edición génica y vectores lentivirales para generar células ARI-CAR-T universales

Una vez analizada la eficiencia y los potenciales riesgos que conllevan el proceso de interrupción del TCR endógeno, combinamos esta estrategia con la expresión de moléculas CARs. En primer lugar, comparamos diferentes protocolos usando la electroporación de CRISPR/Cas9 como RNPs y la transducción con vectores lentivirales expresando el CAR, obteniendo las mayores eficiencias realizando primero transducción (CAR) y después edición (KO)(**Figuras 16A, B**).

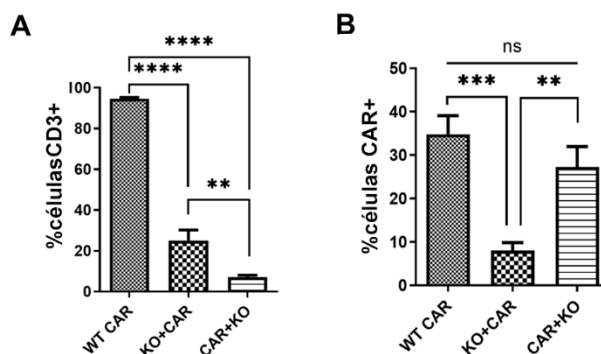


Figura 16. Estandarización del protocolo para la generación de las células TCRKO CAR-T. Para el estudio de la mejor estrategia para generar las células TCRKO CAR-T comparamos un protocolo en el que primero eliminamos el TCR y luego transducimos con los VIs para expresar el CAR (KO+CAR) con otro protocolo en el que primero realizamos la transducción y luego la edición del TCR (CAR+KO). **(A)** Gráfica que representa la eficiencia de edición obtenida con cada protocolo, analizada como el porcentaje de células CD3+. **(B)** Gráfica mostrando la eficiencia de transducción como el porcentaje de células CAR+. Las gráficas muestran la media \pm SEM (2 donantes independientes, n=5). La estadística se basa en un Student's t-test pareado de dos colas, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,0001.

Basándonos en estos estudios, se aislaron PBMCs de donantes sanos, fueron cultivadas en medio TexMACs suplementado con 20 ng/ml de IL-2 y 5% de suero humano y activadas con una nanomatriz anti-CD3/CD28. Tras 48h de activación, las PBMCs fueron transducidas con vectores lentivirales expresando ARI-0001 (MOI=10). Dos o tres días después, las células fueron electroporadas con RNPs ARNg_{TRAC}/Cas9 para generar las células ARI-CAR-T universales (TCRKO ARI) (**Figura**

17A). También generamos células ARI-CAR-T no editadas (WT ARI) y células no transducidas y no editadas (NT). Las células TCRKO ARI mantuvieron el porcentaje de células CAR+ previo a la edición ($34,8\% \pm 21,1$ vs $34,4\% \pm 18,8$, $p=0,86$), pese a que los niveles de expresión fueron ligeramente superiores en las células TCRKO (**Figuras 17B, C**). El número de copias integradas por células también se mantuvo estable tras la edición con las RNPs, aunque en tres de los cuatro casos analizados hubo un pequeño aumento tras la edición ($1,8 \pm 0,3$ vs $2,2 \pm 0,4$, $p=0,16$) (**Figura 17D**).

Respecto a las características fenotípicas basales, a pesar de la variabilidad inter-donante, observamos una tendencia de una menor frecuencia de T_N/T_{SCM} y T_{CM} en las células TCRKO ARI (**Figura 17E**). Tanto las células TCRKO ARI como WT ARI tenían niveles de expresión similares de los receptores inhibidores TIM3 y LAG3 (**Figura 17F**).

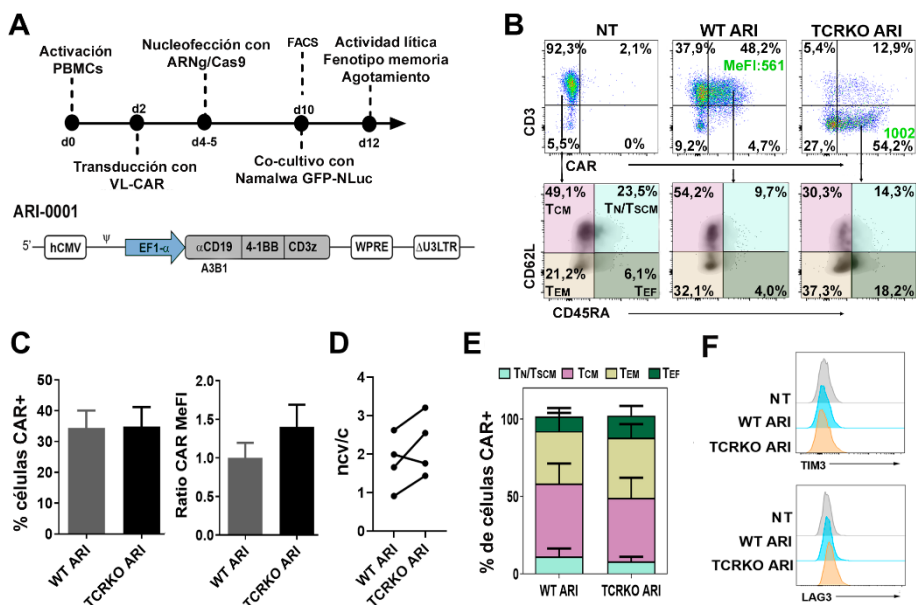


Figura 17. Generación y caracterización de células ARI-CAR-T universales. (A)

Arriba, línea de trabajo experimental. Abajo, representación esquemática del vector lentiviral para expresar ARI-0001, un CAR anti-CD19 de segunda generación. **(B)** Arriba, gráficos de puntos representativos mostrando la expresión del CAR y CD3 en células T control (NT), células T expresando el ARI (WT ARI) y células T expresando el ARI editadas para el TCR (TCRKO ARI). Se muestran los porcentajes de células CAR+CD3+, CAR+CD3-, CAR-CD3+ y CAR-CD3-, así como los niveles de expresión (la mediana de intensidad

de fluorescencia, MeFI) de la población CAR+CD3+ para WT ARI y CAR+CD3- para TCRKO ARI. Abajo, gráficos de puntos representativos mostrando la expresión del CD45RA y CD62L en células T NT, WT ARI y TCRKO ARI. Se muestran los porcentajes de células $T_{N/TSCM}$, T_{CM} , T_{EM} y T_{EF} . **(C)** Gráficas mostrando el porcentaje de células CAR+ en células WT ARI y TCRKO ARI (izquierda) y la expresión del CAR (MeFI) relativizada a las células WT ARI (derecha) (7 donantes independientes, n=11). **(D)** Número de copias del vector por célula en células WT ARI y TCRKO ARI (4 donantes independientes). **(E)** Porcentaje de las subpoblaciones $T_{N/TSCM}$, T_{CM} , T_{EM} y T_{EF} en células WT ARI y TCRKO ARI a los 10 días de activación con anti-CD3/CD28 (4 donantes independientes, n=4). **(F)** Histogramas representando la expresión de TIM3 (arriba) y LAG3 (abajo) en células NT, WT ARI y TCRKO ARI a los 10 días de activación con anti-CD3/CD28. Las gráficas muestran la media \pm SEM.

1.3. Estado metabólico de las células TCRKO ARI-CAR-T

A continuación, investigamos el perfil bioenergético de las diferentes células generadas, utilizando para ello ensayos de flujo extracelular asociados a la actividad mitocondrial. En concreto, analizamos la tasa de consumo de oxígeno (OCR) para determinar la fosforilación oxidativa mitocondrial (**Figuras 18A, B, C**) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) para evaluar la glucólisis (**Figura 18D**). También calculamos la capacidad respiratoria máxima o SRC (**Figura 18E**), así como el ratio de la producción de ATP mitocondrial (ATPmito) entre el ATP glucolítico (ATPgluco) (**Figura 18F**). La SRC representa el potencial oxidativo máximo de la mitocondria disponible para la producción de energía, y está vinculado con una mayor ventaja bioenergética en las células T en una nueva respuesta al antígeno y en condiciones de estrés metabólico. El ratio de ATPmito/ATPgluco nos indicará la principal vía metabólica para la obtención de energía. Los resultados indican que las células WT y TCRKO ARI presentan un fenotipo metabólico bastante similar, con una actividad oxidativa mitocondrial levemente superior en el caso de las células editadas.

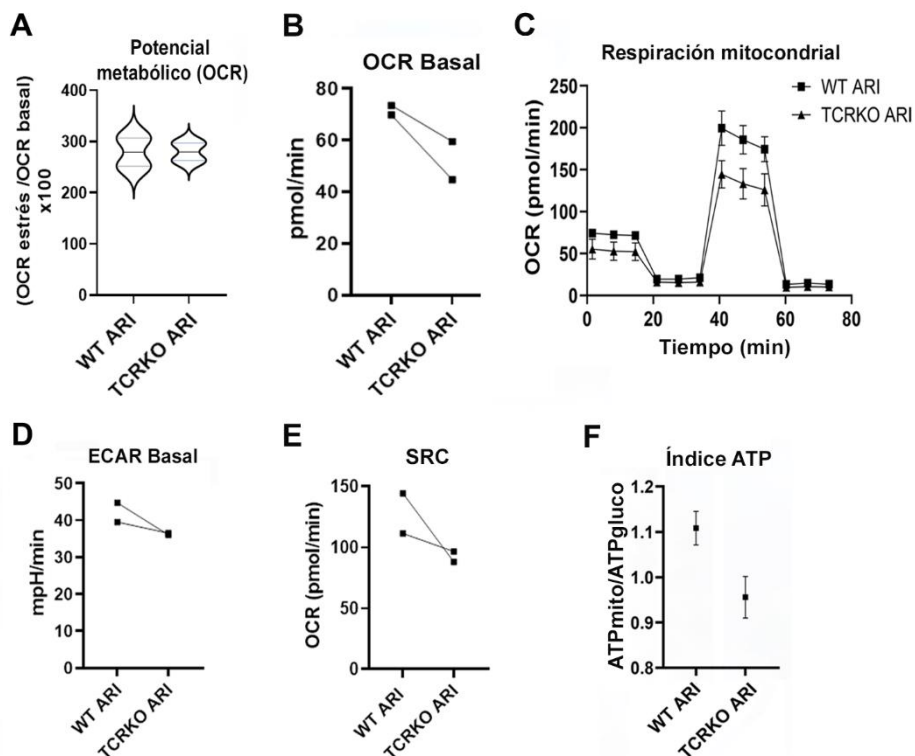


Figura 18. Análisis de la actividad metabólica de las células ARI-CAR-T universales. La actividad mitocondrial fue determinada mediante el "T cell metabolic profiling kit" en el equipo Seahorse XF HS Mini Analyzer (Agilent technologies). Gráficas representando **(A)** Potencial metabólico en base a la tasa de consumo de oxígeno (OCR máximo/OCR basal) x 100%. **(B)** OCR basal (antes de la inyección de oligomicina). **(C)** Consumo de oxígeno (OCR) en el tiempo. **(D)** Tasa de acidificación extracelular (ECAR) basal. **(E)** Capacidad respiratoria máxima (OCR máxima – OCR basal). **(F)** Ratio del ATP mitocondrial entre el ATP glicolítico. (2 donantes independientes, n=2)

1.4. Análisis de la respuesta alogénica de las células TCRKO ARI-CAR-T

Para confirmar que la pérdida de la expresión de TCR en la superficie de las células CAR-T previene la respuesta alogénica, llevamos a cabo un ensayo de estimulación *in vitro*. Las células CAR-T editadas y no editadas fueron teñidas con CTV y se analizó su proliferación tras 6 días en co-cultivo con PBMCs del mismo donante (PBMCs autólogas: auto-PBMCs) o de otro donante diferente (PBMCs alogénicas: alo-PBMCs). Al contrario de lo que ocurrió con las células WT ARI, la proliferación de las células TCRKO ARI (CD4+ y CD8+) (**Figuras 19A, B, C**), así como el grado

de activación (**Figura 19D**) fueron similares en la presencia de PBMCs alogénicas y autólogas. Esto indica que, tal y como era esperable, la eliminación del TCR hace que las células T no respondan a antígenos alogénicos.

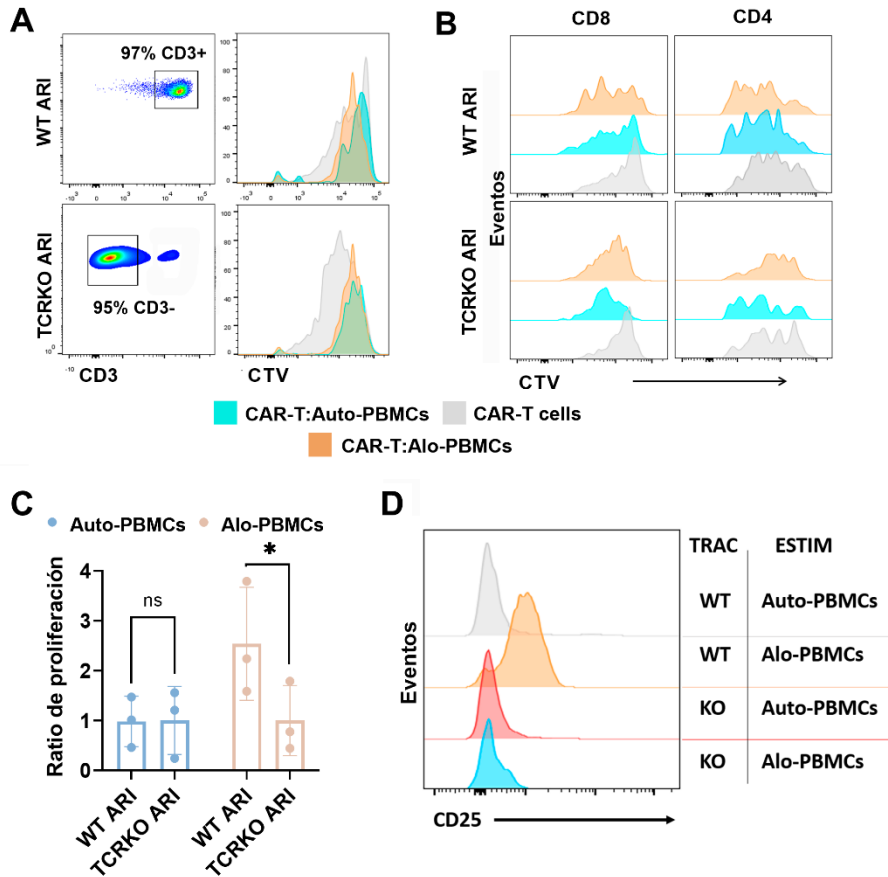


Figura 19. Estudio de la respuesta alogénica de las células ARI-CAR-T universales.

Células WT ARI y TCRKO ARI en estado basal fueron marcadas con *Cell Trace Violet* (CTV) y co-cultivadas con PBMCs autólogas (auto-PBMCs) y PBMCs alogénicas (alo-PBMCs) en un ratio 1:5 en medio sin citoquinas. A los 6 días se determinó la proliferación de las células CAR-T mediante citometría de flujo. **(A)** Izquierda, gráficos de puntos mostrando la población seleccionada para el análisis en cada caso. Derecha, histogramas representativos que muestran la proliferación de las células WT ARI (CD3+, arriba) y TCRKO ARI (CD3-, abajo) sin estimular (gris) y en respuesta a PBMCs alogénicas (naranja) y autólogas (azul). **(B)** Histogramas que muestran la proliferación de las células WT ARI y TCRKO ARI CD8+ (derecha) y CD4+ (izquierda) sin estimular (gris) y en respuesta a PBMCs alogénicas (naranja) y autólogas (azul). **(C)** Gráfica que representa el ratio de proliferación de las diferentes condiciones relativizado frente a las células TCRKO ARI. **(D)** Histograma que muestra la expresión del marcador de activación CD25 de las células WT ARI y TCRKO tras el co-cultivo en las diferentes condiciones. Las gráficas muestran

la media \pm SEM (3 donantes independientes, n=3). La estadística se basa en un Student's t-test pareado de dos colas, *p<0,05.

1.5. Determinación de la actividad anti-leucémica de las células TCRKO ARI-CAR-T

1.5.1. Estudios *in vitro*

La eficacia antitumoral de las células TCRKO ARI comparada con las células WT ARI fue evaluada en un modelo de linfoma de Burkitt, en concreto, se usó la línea celular humana Namalwa. Se sembraron células Namalwa WT o CD19KO (generadas previamente en el laboratorio) en presencia de diferentes números de células CAR-T. En línea con los cambios mínimos observados en términos de fenotipo y actividad metabólica entre células TCRKO ARI y WT ARI, no observamos diferencias en el análisis de la actividad lítica *in vitro* (**Figura 20A, B**). Sin embargo, el análisis fenotípico tras la lisis tumoral mostró la predominancia de la subpoblación T_{EM} en ambas condiciones, y un descenso significativo de la subpoblación T_N/T_{SCM} en las células TCRKO ARI (**Figura 20C**). Las células TCKRO ARI y WT ARI compartieron una expresión comparable de los marcadores de agotamiento LAG3 y TIM3 tras la lisis (**Figura 20D**), así como una producción similar de las citoquinas efectoras IFN γ y TNF α (**Figuras 20E, F**).

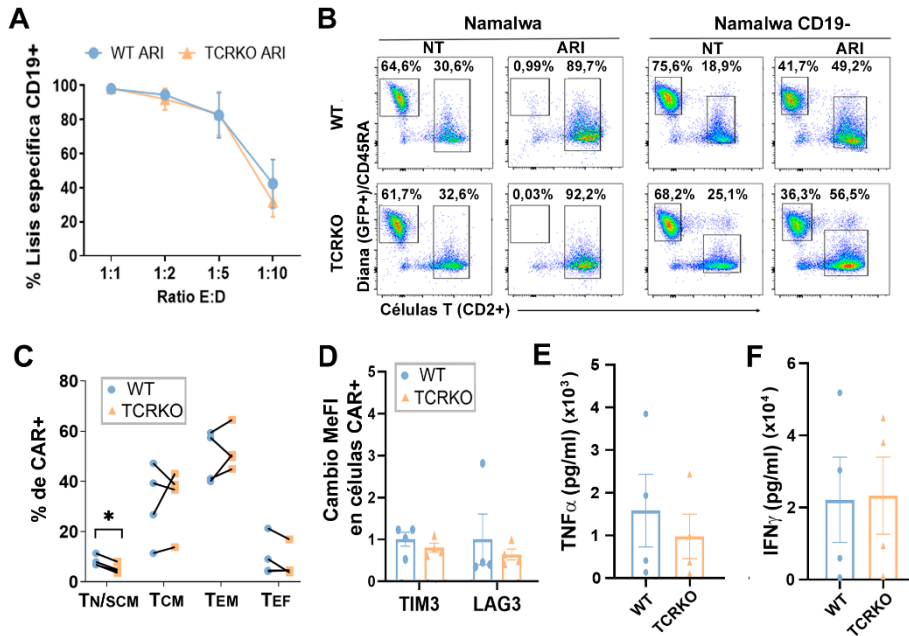


Figura 20. Actividad lítica de las células ARI-CAR-T universales. (A) Gráfica comparando la lisis específica de las células tumorales CD19+ (Namalwa, línea celular de linfoma de Burkitt) mediada por las células WT y TCRKO ARI a diferentes ratios efector:diana (E:D) tras 48h de co-cultivo. (B) Gráficos de puntos representativos que muestran la actividad lítica de las células WT ARI y TCRKO ARI frente a las células Namalwa (GFP+, izquierda) y Namalwa CD19- (GFP-, derecha). El porcentaje de las células GFP+ (células tumorales) y CD2+ (células T) se indica en cada gráfica. (C) Porcentaje de las subpoblaciones T_N/T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM} y T_{EF} en células WT ARI y TCRKO ARI tras 48h de co-cultivo con las células diana (ratio 1:2). (D) Niveles de expresión de TIM3 y LAG3 (MeFI) en las células TCRKO ARI respecto a las células WT ARI tras 48h de co-cultivo con las células diana (ratio 1:2). (E) Secreción de las citoquinas efectoras TNFα e (F) IFNγ por parte de las células CAR-T en respuesta a las células diana tras 24h de co-cultivo. Las gráficas muestran la media ± SEM (4 donantes independientes, n=4). La estadística se basa en un Student's t-test pareado de dos colas, *p<0,05.

El descenso en la subpoblación T_N/T_{SCM} dentro de las células TCRKO ARI tras el encuentro con el antígeno, sugirió que estas células podrían ser menos eficientes que las células WT ARI en la eliminación de las células tumorales tras varios encuentros. Para estudiar esta posibilidad, diseñamos un ensayo de estimulación repetida con el antígeno tumoral, tal y como se muestra en la **Figura 21A**. Las células TCRKO ARI mostraron una actividad antitumoral comparable a las células WT ARI tras cada encuentro (**Figuras 21B, C**). En ambos casos, las subpoblaciones con mayor persistencia, T_N/T_{SCM} y T_{CM}, disminuyeron

desde un 40% hasta aproximadamente un 20% tras el primer encuentro, manteniéndose en esos niveles hasta el cuarto encuentro (**Figura 21D**). Como podemos observar en la **Figura 21E**, la expresión de dos (en verde) y tres (en gris) receptores inhibidores (TIM3, PD1, LAG3) se incrementó tras el primer encuentro tanto en células TCRKO ARI como WT ARI.

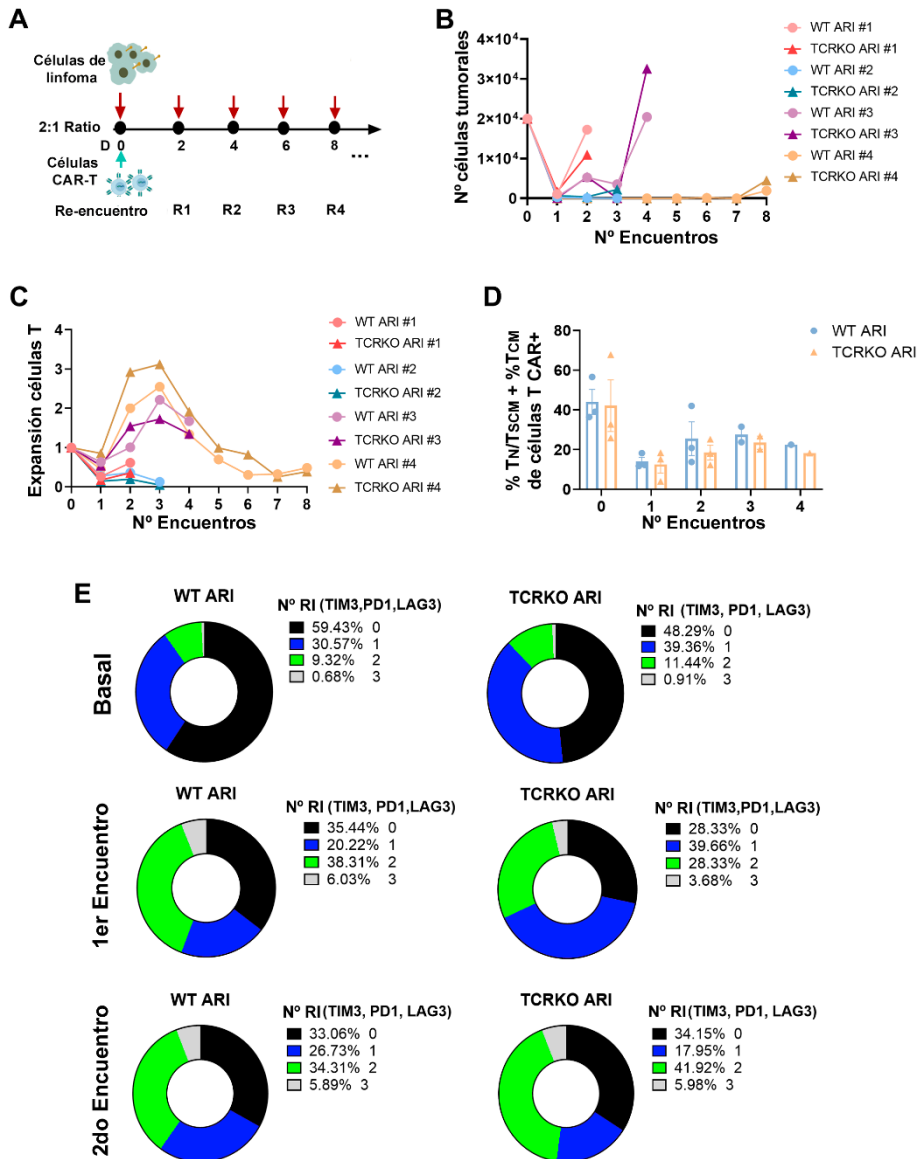


Figura 21. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición repetida al antígeno tumoral. (A) Esquema del ensayo de lisis seriada. Las células CAR-T fueron

co-cultivadas con las células Namalwa (E:D = 1:2) y se re-estimularon cada dos días. **(B)** Gráfica que muestra el número de células tumorales restantes tras cada encuentro (48h) (4 donantes independientes, n=4). **(C)** Expansión relativa de las células T totales tras cada encuentro (4 donantes independientes, n=4). **(D)** Porcentaje de células $T_N/T_{SCM}+T_{CM}$ de las células WT ARI y TCRKO ARI tras los diferentes encuentros con las células Namalwa (3 donantes independientes, n=3). **(E)** Gráficos que indican el porcentaje de expresión de 0 (negro), 1 (azul), 2 (verde) y 3 (gris) marcadores de agotamiento/ receptores inhibidores (TIM3, LAG3, PD1) en células WT ARI (izquierda) y células TCRKO ARI (derecha) en estado basal (arriba), tras el primer (en medio) y tras el segundo encuentro (abajo) con células Namalwa (3 donantes independientes, n=3). Las gráficas muestran la media \pm SEM.

Para estresar aún más el sistema diseñamos un segundo experimento de estimulación repetida en el que las células CAR-T, expandidas durante 10 días en presencia de IL-7 e IL-15, fueron enfrentadas cada 24 h con nuevas células Namalwa a un ratio E:D 1:1 con un total de 8 encuentros (**Figura 22A**). Como se observa en la **Figura 22B**, tanto las células TCRKO ARI como WT ARI mediaron una lisis eficiente de las células de linfoma tras cada encuentro. Sin embargo, en los últimos dos encuentros, las células TCRKO ARI parecen reducir su actividad con respecto a las WT (sin llegar a ser significativo). Por otro lado, ambas condiciones alcanzaron una expansión celular máxima similar tanto en número total de células T (**Figura 22C**) como en número total de células CAR-T (**Figura 22D**). En ambos casos, las células CAR-T mantuvieron un porcentaje alto de células $T_N/T_{SCM} + T_{CM}$ hasta el encuentro número 7 (**Figura 22E**). Además, tanto las células CAR-T editadas como las no editadas presentaron una baja co-expresión de los marcadores PD1 y TIM3 a lo largo del experimento, incrementándose dicha expresión en el encuentro 7 (**Figura 22F**).

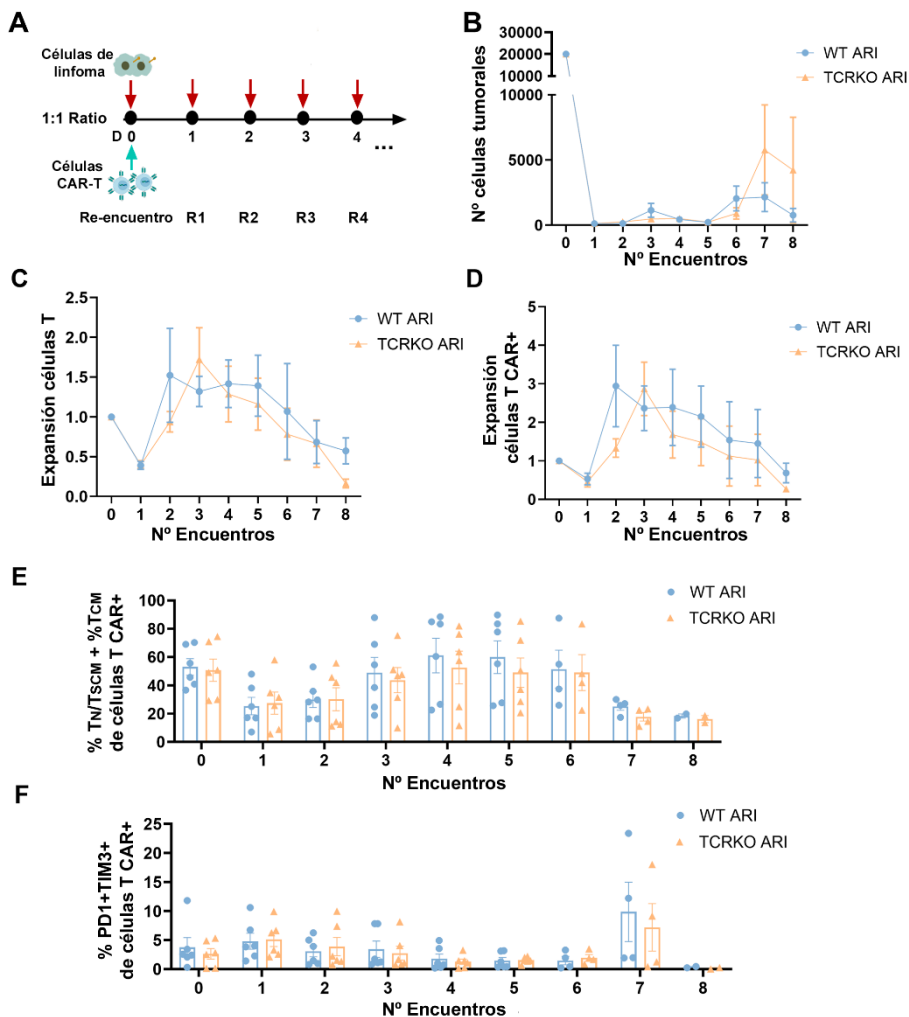


Figura 22. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición muy frecuente con antígeno tumoral. (A) Esquema del segundo ensayo de lisis seriada. Las células CAR-T fueron co-cultivadas con las células Namalwa (E:D = 1:1) y se re-estimularon cada día. (B) Gráfica que muestra el número de células tumorales restantes tras cada encuentro (24h). (C) Expansión relativa de las células T totales tras cada encuentro, calculada dividiendo el número de células T total determinado por CF tras cada encuentro entre el número de células sembradas a tiempo 0. (D) Expansión relativa de las células CAR-T tras cada encuentro, calculada dividiendo el número de células CAR-T total determinado por CF tras cada encuentro entre el número de células sembradas a tiempo 0. (E) Porcentaje de células $T_N/T_{SCM}+T_{CM}$ de las células WT ARI y TCRKO ARI tras los diferentes encuentros con las células Namalwa. (F) Porcentaje de células PD1+TIM3+ de las células WT ARI y TCRKO ARI tras cada encuentro. Las gráficas muestran la media \pm SEM (6 donantes independientes, n=6).

Como nuestro objetivo es generar un producto terapéutico “listo para usar”, finalmente comparamos la eficacia antitumoral y el fenotipo de los productos TCRKO ARI y WT ARI preparados en fresco (F) y tras sufrir un ciclo de congelación y descongelación (C). En ambos casos las células conservaron la actividad lítica (**Figura 23A**). Sin embargo, las células TCRKO ARI y WT ARI que habían sido congeladas-descongeladas presentaron una reducción en el porcentaje de células $T_N/T_{CM} + T_{CM}$ en comparación con las células frescas (**Figura 23B**). El nivel de agotamiento, representado como el porcentaje de células CAR-T $TIM3+LAG3+$, se mantuvo similar en todas las condiciones (**Figura 23C**).

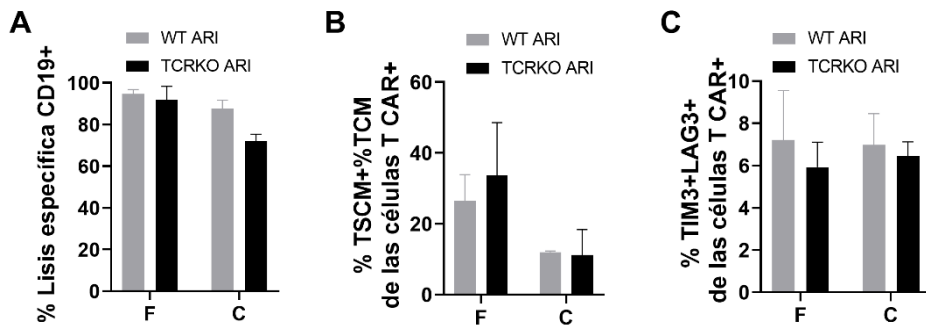


Figura 23. Efecto de un ciclo de congelación-descongelación en las células ARI-CAR-T universales. (A) Actividad lítica específica CD19+ de células WT ARI y TCRKO ARI frescas (F) y congeladas-descongeladas (C). **(B)** Porcentaje de células $T_N/T_{SCM}+T_{CM}$ y **(C)** células PD1+TIM3+ de las células WT ARI y TCRKO ARI frescas (F) y congeladas-descongeladas (C) tras el primer encuentro con las células diana. Las gráficas muestran la media \pm SEM (2 donantes independientes, n=2).

En resumen, todos estos resultados muestran que no existen diferencias significativas entre las células TCRKO ARI y WT ARI en términos de citotoxicidad, actividad mitocondrial y proliferación celular *in vitro*.

1.5.2. Ensayos preclínicos en modelos de ratón

Finalmente comparamos la eficacia antitumoral de las células TCRKO ARI y WT ARI en un modelo xenogénico de linfoma. Ambos productos fueron preparados con antelación como se describe en M&M y congelados en nitrógeno líquido. Ratones inmunodeficientes NSG (NOD scid gamma) fueron inoculados intravenosamente (i.v.) con células Namalwa (expresando eGFP-NLuc). Tres días después, las células CAR-

T, así como células T NT, fueron descongeladas e inoculadas i.v. (**Figura 24A**). La progresión de la enfermedad fue evaluada por bioluminiscencia (**Figura 24B**). Los ratones control (inoculados solo con Namalwa y los inoculados con Namalwa y células T NT) presentaron una progresión rápida del linfoma y fueron sacrificados 16 días después de la inoculación de las células tumorales. Tras 31 días, los ratones tratados con células TCRKO ARI presentaron una supervivencia del 50% , mientras que la supervivencia de los tratados con células WT ARI fue del 40%. En este punto, realizamos una re-inoculación de células Namalwa a todos los ratones supervivientes (incluido un ratón que había recibido células T NT) con el objetivo de determinar la actividad antitumoral de las células CAR-T que podrían persistir en el ratón. Se generaron nuevos controles PBS y la progresión tumoral fue monitorizada hasta día 56. Pasado este tiempo, los ratones tratados con TCRKO ARI o WT ARI presentaron un supervivencia similar (20% vs 17%) (**Figuras 24B, C, D**). A destacar, dos ratones tratados con células WT ARI fueron sacrificados por presentar signos de EICH en ausencia de tumor, mientras que no se detectaron signos de EICH en ningún ratón inoculado con células TCRKO ARI (**Figura 24E**).

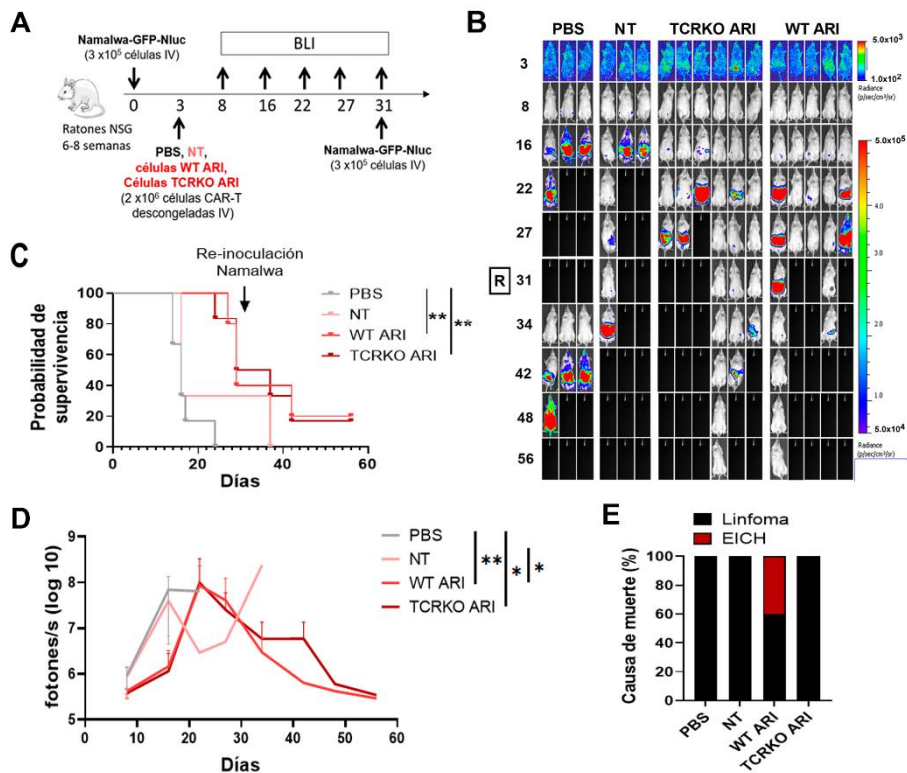


Figura 24. Actividad antitumoral in vivo de las células ARI-CAR-T universales en un modelo de linfoma de Burkitt. (A) Esquema del diseño experimental. Ratones inmunosuprimidos (NSG) fueron inoculados i.v. con 300 000 células Namalwa-GFP-NLuc, y a los 3 días se repartieron los grupos (de manera que no hubiera grandes diferencias en señal) y se inocularon i.v. 2x10⁶ de células CAR-T (50% CAR+), previamente descongeladas. Los grupos fueron ratones no tratados (PBS) o inoculados con células NT, WT ARI y TCRKO ARI (PBS=3, NT=3, WT ARI=5, TCRKO ARI=6). (B) Imágenes de bioluminiscencia (BLI) que indican el desarrollo del tumor en los diferentes grupos de ratones a diferentes días tras la inoculación de las células tumorales. A día 31 se realizó una nueva inoculación (re-exposición al antígeno) con células tumorales en todos los ratones supervivientes. Se indica la escala de fotones usada para día 3 y días 8-56. (C) Probabilidad de supervivencia de los diferentes grupos de ratones. Los ratones fueron sacrificados cuando experimentaron una pérdida de peso >20% o una señal de bioluminiscencia >5x10⁷ fotones/s. (D) Cuantificación de la señal de bioluminiscencia (fotones/s) de cada grupo de ratones a diferentes tiempos. (E) Incidencia (%) de muertes asociadas a linfoma y a EICH xenogénica en los diferentes grupos de ratones. Las gráficas muestran la media ± SEM. La estadística se basa en el log Rank test (C) y Student's t-test no pareado de una cola, *p<0,05, **p<0,01.

Los ratones sacrificados, estos son los que experimentaron una pérdida de peso >20% o una señal de bioluminiscencia >5x10⁷ fotones/s, fueron diseccionados para la extracción de diferentes órganos con la finalidad

de corroborar los datos de biolumiscencia obtenidos *in vivo* y de tener información mas precisa de la infiltración de las células tumorales en diferentes tejidos. La presencia de células tumorales en médula ósea y en sangre de los animales tratados con células WT ARI y TCRKO ARI fue cero o mínima. Mientras que los datos obtenidos en cerebro, hígado y bazo fueron dispares y, en parte, contradictorios. Debido a la variabilidad experimental, en cerebro no encontramos diferencias significativas entre los grupos, pero sí una tendencia clara a una menor infiltración tumoral en los animales tratados con las células TCRKO ARI. Al contrario, en hígado, los ratones tratados con WT ARI fueron los únicos que redujeron significativamente la infiltración de células Namalwa. En bazo, tanto los ratones tratados con WT ARI como con TCRKO ARI redujeron significativamente la infiltración tumoral respecto a los ratones no tratados (**Figura 25**).

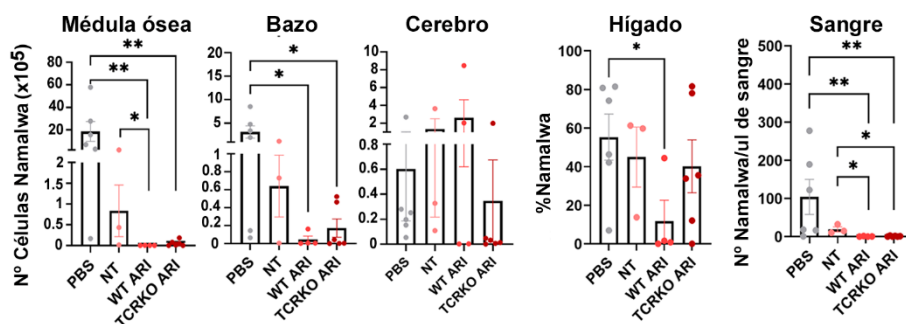


Figura 25. Presencia de células Namalwa en diferentes tejidos. Tras el sacrificio de los ratones se extrajeron y procesaron médula ósea, bazo, cerebro, hígado y sangre. El recuento total de células tumorales fue determinado por citometría de flujo. En el caso del hígado se muestra el porcentaje de células Namalwa, determinado dentro de la región de células humanas. En el caso de la sangre se representa el número de células Namalwa por μ l de sangre. Las gráficas muestran la media \pm SEM. La estadística se basa en Student's t-test no pareado de una cola, *p < 0,05, **p < 0,01.

Con respecto al análisis de las células CAR-T, se encontraron altos niveles de células CAR+ en todos los tejidos analizados, con mayor expansión en bazo e hígado. Si comparamos la presencia de células TCRKO ARI frente a las células WT ARI en los diferentes ratones, existe una tendencia a una mayor abundancia de células WT ARI de manera general (**Figura 26A**). Con respecto al fenotipo de las diferentes células CAR-T, se obtuvo una composición similar del conjunto $T_N/T_{SCM} + T_{CM}$ dentro de

las células TCRKO ARI y WT ARI persistentes en el ratón a punto final (**Figura 26B**). No observamos una correlación entre el nivel de infiltración de las células CAR-T en los diferentes órganos y el fenotipo de las mismas. Interesantemente, el porcentaje final de células CD3- en los órganos hematopoyéticos de los ratones tratados con células TCRKO ARI se mantuvo con respecto al valor de pre-infusión (**Figura 26C**), lo que indicaba que no se había producido una expansión selectiva de las células TCR+. En el caso del cerebro, el ratón que presentaba una mayor selección de las células TCR+ era aquel con mayor infiltración de células CAR-T totales.

Por lo tanto, estos estudios indican que la eliminación del TCR no perjudica la actividad antitumoral de las células ARI-CAR-T en un modelo murino xenogénico de linfoma.

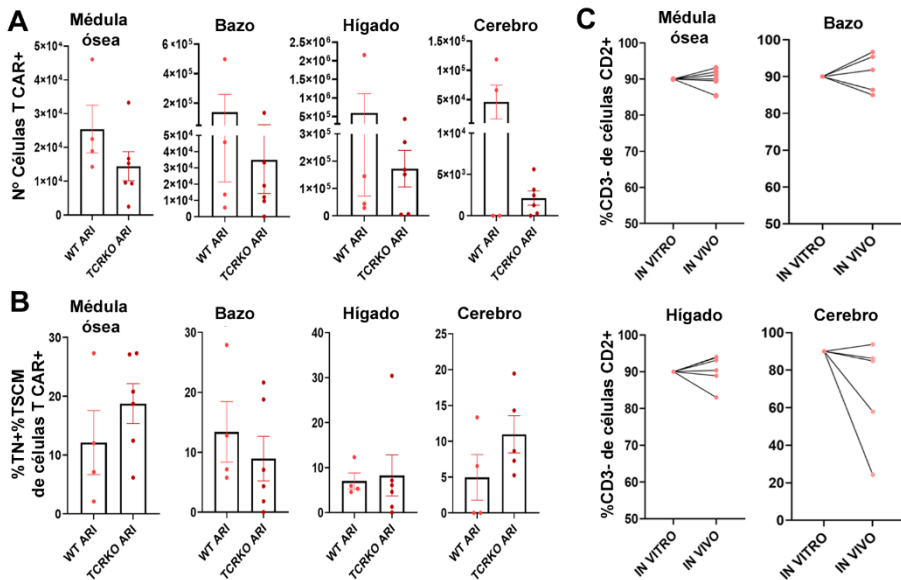


Figura 26. Caracterización fenotípica de las células ARI-CAR-T universales infiltradas en los diferentes órganos murinos. (A) Contaje de las células hCD2+hCD3+CAR+ (WT ARI) y hCD2+hCD3-CAR+ (TCRKO ARI) infiltradas en cada órgano analizado en los ratones tratados con células WT ARI y TCRKO ARI. **(B)** Porcentaje de células T_N/T_{SCM}+T_{CM} dentro de la población hCD2+hCD3+CAR+ / hCD2+hCD3-CAR+ de cada órgano de los ratones tratados con células WT ARI y TCRKO ARI. **(C)** Porcentaje de células hCD2+hCD3- previo a la inoculación (*in vitro*) y en los diferentes órganos tras el sacrificio (*in vivo*). Las gráficas muestran la media ± SEM.

1.6. Adaptación del protocolo para generar células T TCRKO en un electroporador de uso clínico

Puesto que el objetivo final de este proyecto es iniciar estudios clínicos de la plataforma generada, iniciamos una puesta a punto del sistema en un electroporador clínico (grado GMP). Para ello PMBCs de diferentes donantes fueron activadas durante 48h y electroporadas con la RNP_{TRAC} mediante la tecnología ExPERT GTx de Maxcyte. Al adaptar las concentraciones al nuevo electroporador, usamos 60 pmol de ARNg y 29,8 pmol de Cas9 (ratio 2:1) o 19,8 pmol de Cas9 (ratio 3:1) para 2 millones de células. La eficiencia de edición fue similar bajo ambos ratios (~80% CD3) (**Figura 27A**). Además, la subpoblación de células memoria T_N/T_{SCM} permaneció invariable o incluso se incrementó en las células electroporadas (**Figura 27B**), las cuales mantuvieron una capacidad de expansión similar a las células no editadas (**Figura 27C**). Por lo tanto, la combinación de nuestra plataforma con esta tecnología permite generar células T TCRKO con una alta eficiencia y una reducción considerable en la cantidad de reactivos necesarios para formar las RNPs (~ 6 veces menor).

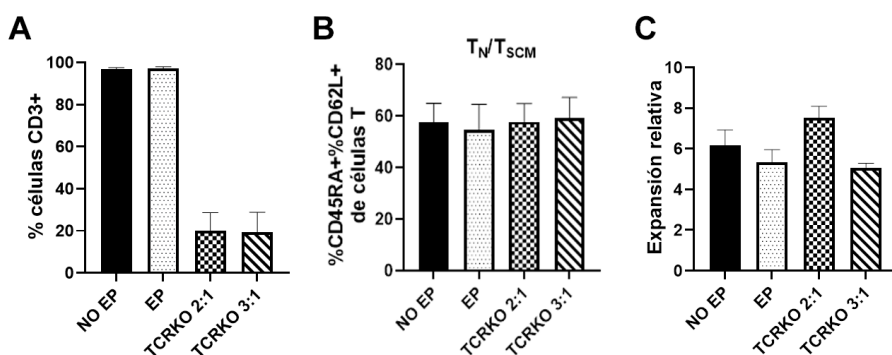


Figura 27. Generación de células T TCRKO usando un electroporador de uso clínico. **(A)** Eficiencia de edición determinada por citometría de flujo (% CD3+) de células no electroporadas (NO EP), electroporadas con Cas9 (EP) y electroporadas con RNP_{TRAC} con un ratio ARNg:Cas9 2:1 (TCRKO 2:1) y 3:1 (TCRKO 3:1). **(B)** Porcentaje de células T_N/T_{SCM} de las células T en las diferentes condiciones. **(C)** Expansión relativa de las células en cultivo tras una semana del proceso. Las gráficas muestran la media ± SEM (3 donantes independientes, n=3).

2. MEJORA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS CÉLULAS CAR-T UNIVERSALES MEDIANTE INTERVENCIÓN METABÓLICA

2.1. Expansión de células T primarias en presencia de moduladores metabólicos

Una de las estrategias actuales para mejorar la persistencia y actividad de la terapia adoptiva con células CAR-T consiste en la selección de la subpoblación T_{SCM} por su gran potencial terapéutico. Una alternativa a esta selección física podría ser la inducción de la población deseada mediante el uso de factores farmacológicos que pueden activar o inhibir rutas metabólicas clave.

El grupo del Prof. Pedro Romero ha realizado una extensa labor de caracterización de las células T_{SCM} generadas naturalmente e inducidas farmacológicamente. Por tanto, todos sus estudios presentan una aplicación directa a las inmunoterapias con células T. Esto me llevó a realizar una estancia en su laboratorio. Durante este tiempo, entre otras cosas, estudié si el uso de diferentes inhibidores podrían inducir o no la población de células T_{SCM} en células editadas para el TCR. Para ello se planificó el experimento mostrado en la **Figura 28A**. Brevemente, las PBMCs aisladas de sangre periférica de diferentes donantes sanos, fueron cultivadas en medio RMPI suplementado con 8% de suero humano y 150 U/ml de IL-2 y activadas con α CD3/CD28. A las 48 h fueron electroporadas con RNPs_{TRAC} (TCRKO) o solo con Cas9 como control (WT). Tres días tras la electroporación, las células fueron divididas en cuatro condiciones para ser cultivadas en presencia de diferentes inhibidores y sus respectivos controles (cuadro azul, **Figura 28A**). Los inhibidores de interés a testar eran un inhibidor de la enzima deshidrogenasa de isocitrato mitocondrial, IDH2 (IDH2i, AG221) la cual también puede mediar la carboxilación reductiva de la glutamina a isocitrato en la mitocondria, y un inhibidor del transportador de piruvato mitocondrial, MPC (MPCi, UK5099) (ver **Figura 28B**). Como control positivo se utilizó un inhibidor de PI3K δ (PI3K δ i, CAL-101) y como

control negativo las células fueron cultivadas en el solvente (DMSO). El fenotipo de las células T fue analizado por citometría de flujo tras 9 días en presencia de los inhibidores. Se utilizó un panel de anticuerpos más amplio que anteriormente para poder identificar a las diferentes subpoblaciones de células T. Según el trabajo de Gattinoni y cols., (Gattinoni et al., 2011) identificamos a las células T_{SCM} como CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD45RO- CD95+ CD28+ CD27+ y las células T_{CM} como CD45RA- CD62L+ CCR7+ CD45RO+ CD95+ CD28+ CD27+. Ninguno de los compuestos indujo ni una población T_{SCM} ni T_{CM} definidas con estos marcadores en las células TCRKO (**Figuras 28C, D**) ni en las nucleofectadas con Cas9 (**Figuras 28E, F**). Sin embargo, si realizamos un análisis más simple, basado en CD45RA y CD62L, sí que hay una inducción de estas poblaciones memoria tras el tratamiento con IDH2i y PI3Kδi tanto en células WT (**Figuras 28G, H**) como TCRKO (**Figuras 28I, J**).

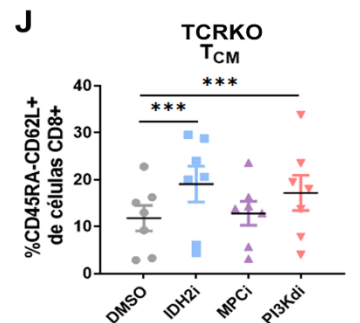
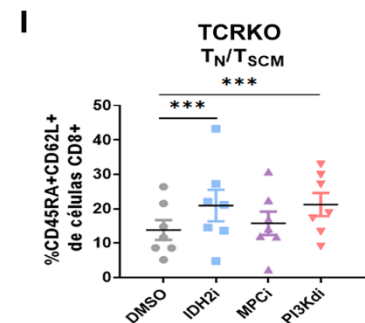
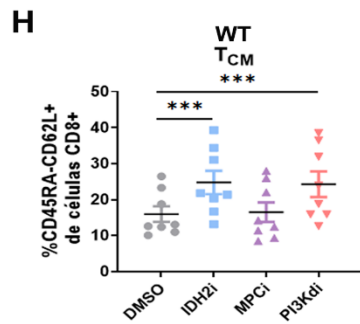
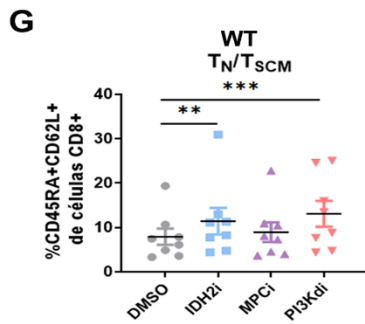
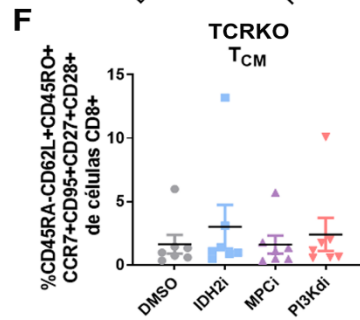
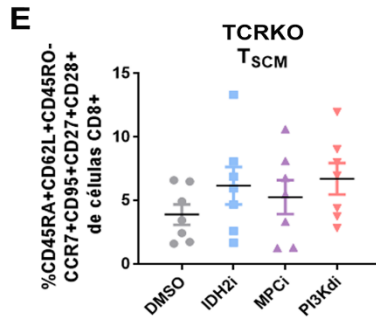
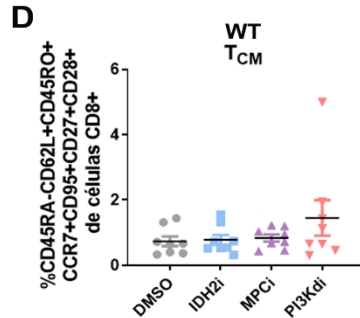
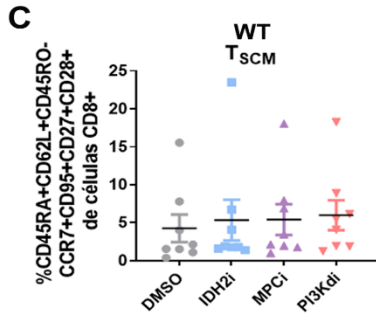
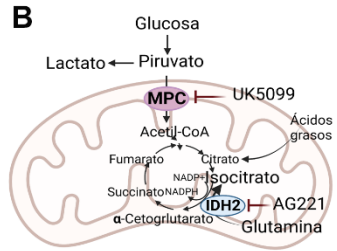
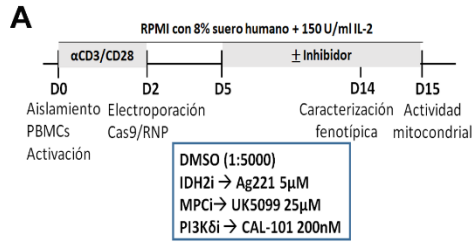


Figura 28. Análisis fenotípico de células T TCRKO tratadas con moduladores metabólicos. **(A)** Representación esquemática de la cronología seguida para el cultivo *in vitro* de células T editadas con RNP_{TRAC} (TCRKO) y electroporadas con Cas9 (WT) con los diferentes inhibidores o el control (DMSO). **(B)** Esquema de las rutas metabólicas donde intervienen los inhibidores metabólicos a estudiar, MPCi (UK5099) inhibe el transportador mitocondrial de piruvato e IDH2i (AG221) inhibe a la enzima deshidrogenasa de isocitrato. **(C)** Porcentaje de células T_{SCM} (CD45RA+CD62L+CD45RO-CCR7+CD95+CD27+CD28+) dentro de las células T CD8+ WT. **(D)** Porcentaje de células T_{CM} (CD45RA-CD62L+CD45RO+CCR7+CD95+CD27+CD28+) dentro de las células T CD8+ WT. **(E)** Porcentaje de células T_{SCM} (CD45RA+CD62L+CD45RO-CCR7+CD95+CD27+CD28+) dentro de las células T CD8+ TCRKO. **(F)** Porcentaje de células T_{CM} (CD45RA-CD62L+CD45RO+CCR7+CD95+CD27+CD28+) dentro de las células T CD8+ TCRKO. **(G)** Porcentaje de células T_N/T_{SCM} (CD45RA+CD62L+) dentro de las células T CD8+ WT. **(H)** Porcentaje de células T_{CM} (CD45RA-CD62L+) dentro de las células T CD8+ WT. **(I)** Porcentaje de células T_N/T_{SCM} (CD45RA+CD62L+) dentro de las células T CD8+ TCRKO. **(J)** Porcentaje de células T_{CM} (CD45RA-CD62L+) dentro de las células T CD8+ TCRKO. Las gráficas muestran la media ± SEM (7 donantes independientes, n=7). La estadística se basa en un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons test), **p<0,01, ***p<0,005.

Como marcadores de agotamiento mantuvimos TIM3, LAG3 y PD1. Analizando la expresión de 0, 1, 2 o 3 marcadores en células T WT y TCRKO tratadas con los diferentes compuestos podemos observar que el mayor efecto positivo se consigue en las células tratadas con PI3Kδi, aunque no llega a ser significativo (**Figuras 29A, B**). Además, ninguno de los compuestos tuvo efecto en la proliferación de las células T en base a la dilución de CFSE de células T que habían sido expandidas en presencia de estos inhibidores tras ser activadas con anti-CD3/CD28 (**Figura 29C**).

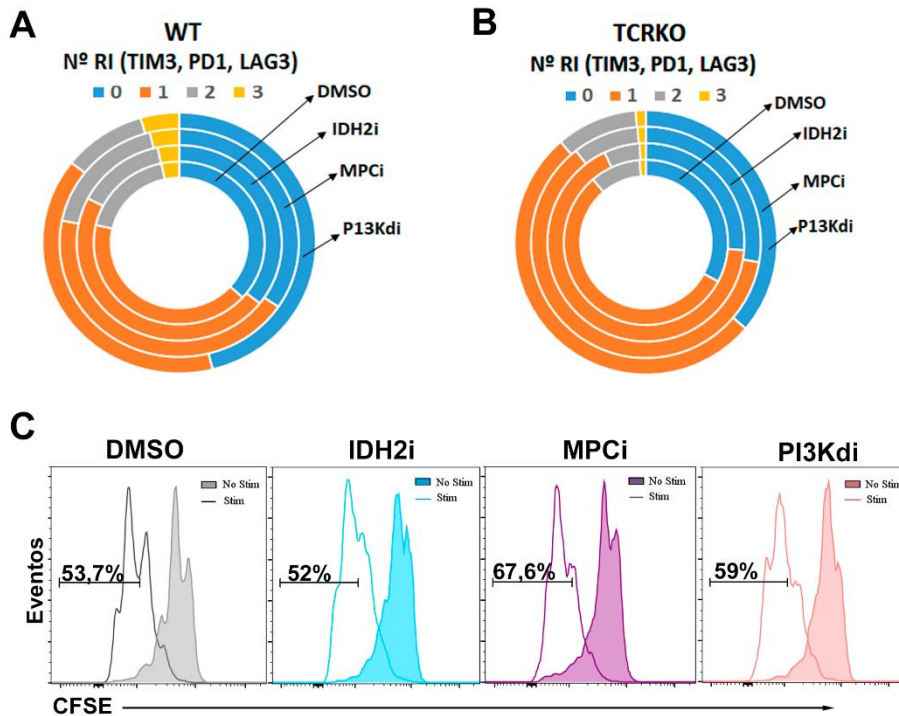


Figura 29. Análisis de marcadores de agotamiento de células T TCRKO tratadas con moduladores metabólicos. Las células T fueron editadas para el TCR con CRISPR/Cas9 y cultivadas en presencia de los inhibidores y tras 9 días de expansión se analizó la expresión de TIM3, PD1 y LAG3 dentro de la población CD8+. **(A)(B)** Gráficos representativos indicando el porcentaje de expresión de 0 (azul), 1 (naranja), 2 (gris) y 3 (amarillo) marcadores de agotamiento/receptores inhibidores (RI) (TIM3, PD1 y LAG3) en células T CD8+ WT **(A)** y TCRKO **(B)** tratadas con los diferentes inhibidores. Las gráficas muestran la media (7 donantes independientes, n=8). **(C)** Las células T WT expandidas en presencia de los inhibidores, fueron lavadas, teñidas con CFSE y activadas con anti-CD3/CD28. A los 4 días de activación se determinó su proliferación mediante CF. Se representan histogramas representativos dentro de la población CD3+CD8+. Las gráficas coloreadas representan células no estimuladas (No Stim) y las gráficas sin relleno representan células estimuladas (Stim). Se indica el porcentaje de células que presentan una elevada tasa de división.

Como hemos expuesto previamente, otra característica de las células T memoria es un fenotipo mitocondrial activo para mediar una rápida respuesta y de mayor magnitud frente a un re-encuentro con el antígeno. Por lo tanto, las células T memoria se corresponden con una mayor masa mitocondrial (calculada mediante tinción con MG) y un mayor potencial de membrana mitocondrial (medido a través de la tinción con TMRM). Únicamente el inhibidor para MPC incrementó

significativamente el porcentaje de mitocondrias energéticas y disminuyó el porcentaje de mitocondrias con bajo potencial tanto en células T TCRKO como WT (**Figura 30A**). Además, si comparamos las células editadas con el control, las células TCRKO presentaron un porcentaje de mitocondrias energéticas mayor que las células WT con todos los tratamientos, excepto en el caso de MPCi (**Figura 30B**), indicando que su efecto no puede ser incrementado tras la eliminación del TCR.

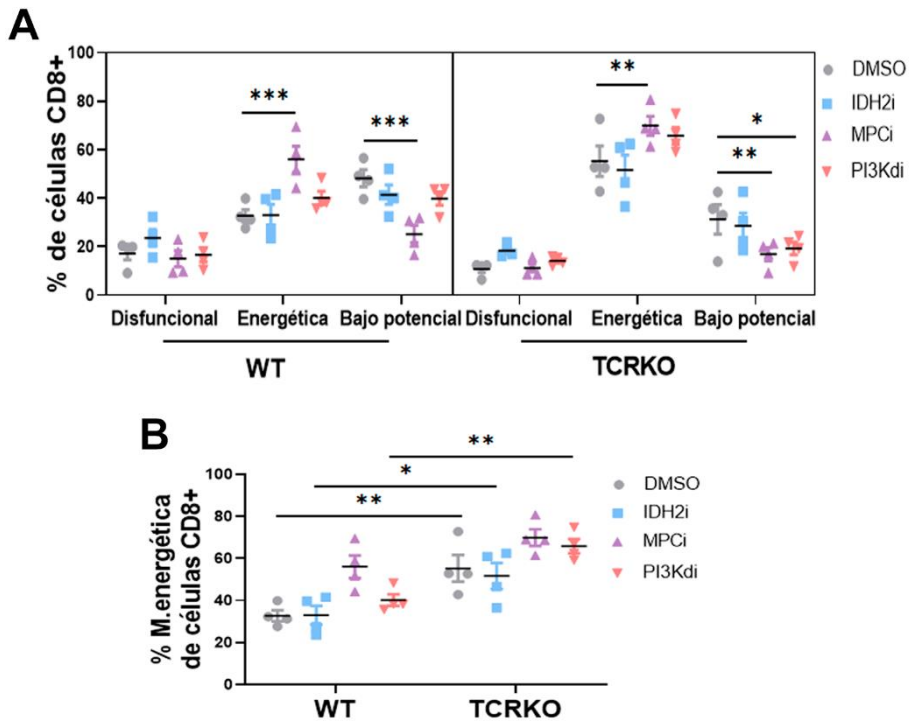


Figura 30. Estado metabólico de las células T TCRKO tratadas con moduladores metabólicos. (A) Porcentaje de células con una mitocondria disfuncional, energética y de bajo potencial dentro de las células T CD8+ WT y TCRKO tratadas con los inhibidores. **(B)** Gráfica comparando el porcentaje de mitocondrias energéticas dentro células T CD8+ WT y TCRKO. Las gráficas muestran la media \pm SEM (4 donantes independientes, n=4). La estadística se basa en un test one-way ANOVA (Dunnnett's multiple comparisons test), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

2.2. Tratamiento de las células TCRKO ARI-CAR-T con los moduladores metabólicos

Con estos resultados y tras mi vuelta a Granada analizamos el efecto de estos inhibidores durante la generación de las células ARI-CAR-T, ahora siguiendo nuestros protocolos de cultivo, más aproximados a la fórmula clínica. Además, en base a otros estudios realizados decidimos iniciar el tratamiento con los inhibidores desde el momento de la activación de las células T, de manera que seguimos el protocolo indicado en la **Figura 31A** para el tratamiento farmacológico de las células ARI editadas para el TCR (TCRKO ARI) o sin editar (WT ARI). El tratamiento con los inhibidores no afectó a la eficiencia de transducción ni edición (**Figuras 31B, C**). Únicamente el inhibidor para MPC indujo eficientemente la población T_N/T_{SCM} tanto en células WT ARI como TCRKO ARI, aunque la subida en estas últimas es algo menor (**Figuras 31D, E**). Con respecto al agotamiento de las células CAR-T, no encontramos diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (**Figura 31F**). El crecimiento total de las células T no se comprometió por la inhibición de MPC o IDH2 durante 10 días de expansión *ex vivo*. Sí que observamos una tendencia a una menor expansión de las células TCRKO ARI con respecto a las células WT ARI bajo las diferentes condiciones, sin llegar a ser estadísticamente significativa (**Figura 31G**).

Esto sugiere que la expansión *ex vivo* de las células ARI-CAR-T en presencia del inhibidor para MPC previene la diferenciación de las células CAR-T sin inducir su agotamiento ni comprometer su capacidad de expansión.

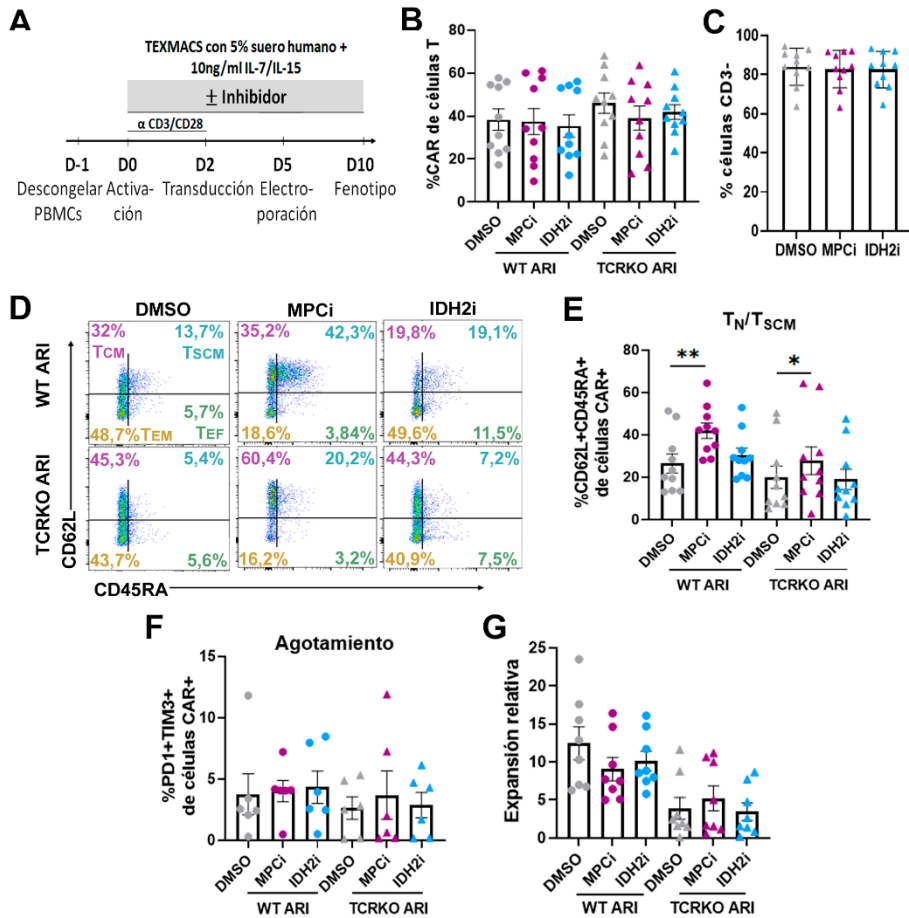


Figura 31. Análisis fenotípico de células TCRKO ARI tratadas con moduladores metabólicos. (A) Representación esquemática de la cronología seguida para el cultivo *in vitro* de células T transducidas con LV-ARI (WT ARI) y editadas con RNP_{TRAC} (TCRKO ARI) con los inhibidores para MPC o IDH2 o con el control DMSO. (B) Porcentaje de células CAR⁺ dentro de las células WT ARI y TCRKO ARI cultivadas en las diferentes condiciones (6 donantes independientes, n=10). (C) Eficiencia de edición de las células ARI electroporadas con RNP_{TRAC} cultivadas en presencia de los inhibidores (6 donantes independientes, n=10). (D) Gráficos de puntos representativos mostrando la expresión del CD45RA y CD62L en células WT ARI y TCRKO ARI tratadas con los inhibidores. Se muestran los porcentajes de células T_N/T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM} y T_{EF}. (E) Porcentaje de células T_N/T_{SCM} (CD45RA⁺CD62L⁺) dentro de las células WT ARI y TCRKO ARI tratadas con los inhibidores (6 donantes independientes, n=10). (F) Porcentaje de células PD1⁺TIM3⁺ de células WT ARI y TCRKO ARI tratadas con los inhibidores (5 donantes independientes, n=5). (G) Expansión relativa de las células WT ARI y TCRKO ARI tratadas con los inhibidores tras 10 días de cultivo (6 donantes independientes, n=8). Las gráficas muestran la media ± SEM. La estadística se basa en un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons test), *p<0,05, **p<0,01.

2.3. Efecto de los moduladores metabólicos en la actividad antitumoral de las células TCRKO ARI-CAR-T

Tras observar este incremento de la población T_N/T_{SCM} en las células ARI-CAR-T tratadas con el inhibidor para MPC, pasamos a valorar si esta inducción podía correlacionarse con una mejor actividad antitumoral. En primer lugar, comparamos la capacidad citolítica de las células TCRKO ARI y WT-ARI tratadas con MPCi o con DMSO en un ensayo de lisis seriada frente a las células Namalwa (**Figura 32A**). Solo se observó un efecto positivo en las células WT ARI tratadas con el inhibidor de MPC, que fueron capaces de controlar eficientemente a las células diana durante dos encuentros más que las células no tratadas (**Figura 32B**). Sin embargo, no se observó ningún efecto en la actividad antitumoral de células TCRKO ARI (**Figura 32C**) ni en la expansión de las células WT ARI (**Figura 32D**) ni de las TCRKO ARI (**Figura 32E**). Las células WT ARI, tratadas con o sin inhibidor, alcanzaron mayor expansión en comparación con las células TCRKO ARI.

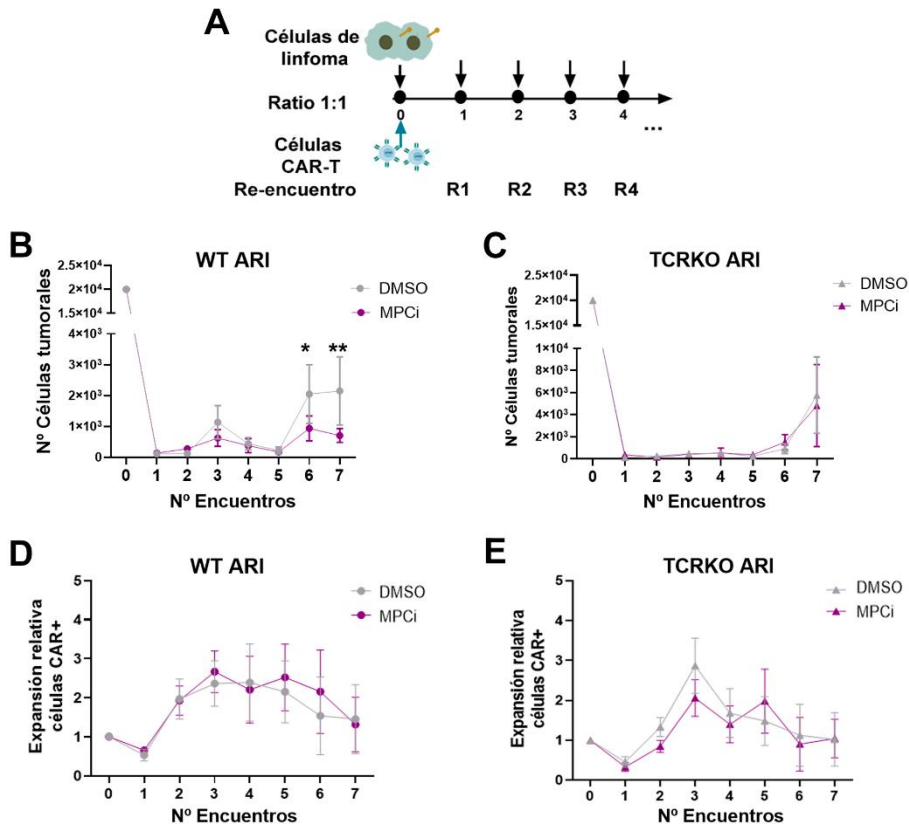


Figura 32. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición frecuente con el antígeno tumoral en un modelo de linfoma. (A) Esquema del ensayo de lisis seriada. Las células CAR-T tratadas con los inhibidores durante 10 días, fueron lavadas y co-cultivadas con las células Namalwa (E:D = 1:1) y se re-estimularon cada día. **(B)** Gráfica que muestra el número células tumorales restantes tras cada encuentro (24h) con las células WT ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi. **(C)** Gráfica que muestra el número células tumorales restantes tras cada encuentro (24h) con las células TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi. **(D)** Expansión relativa de las células CAR+ dentro de las células WT ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi tras cada encuentro con las células diana. **(E)** Expansión relativa de las células CAR+ dentro de las células TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi tras cada encuentro con las células diana. Las gráficas muestran la media \pm SEM (6 donantes independientes, n=6). La estadística se basa en un test two-way ANOVA multiple comparisons, *p<0,05, **p<0,01.

Con respecto al fenotipo, el tratamiento con MPCi indujo un fuerte incremento de la población T_N/T_{SCM} en las células WT ARI. Este efecto fue mantenido hasta el tercer encuentro (**Figura 33A**). En términos de agotamiento, cuantificado como células CAR+PD1+TIM3+, no observamos diferencias significativas entre las diferentes condiciones.

Tal como era esperable, sí observamos un incremento del estado de agotamiento de todas las células CAR-T tras 7 encuentros, aunque en este punto las células WT ARI no pre-tratadas experimentaron un incremento mayor del estado de agotamiento respecto a las células pre-inhibidas con el MPCi (**Figura 33B**). También valoramos si la inhibición de MPC afectaba a la capacidad de las células ARI-CAR-T para producir citoquinas efectoras. Para ello determinamos la concentración de TNF α (**Figura 33C**) e IFN γ (**Figura 33D**) mediante ELISA tras el primer encuentro con células Namalwa. Los valores de estas citoquinas Th1 fueron similares entre las células con los diferentes tratamientos, ya sean editadas o no.

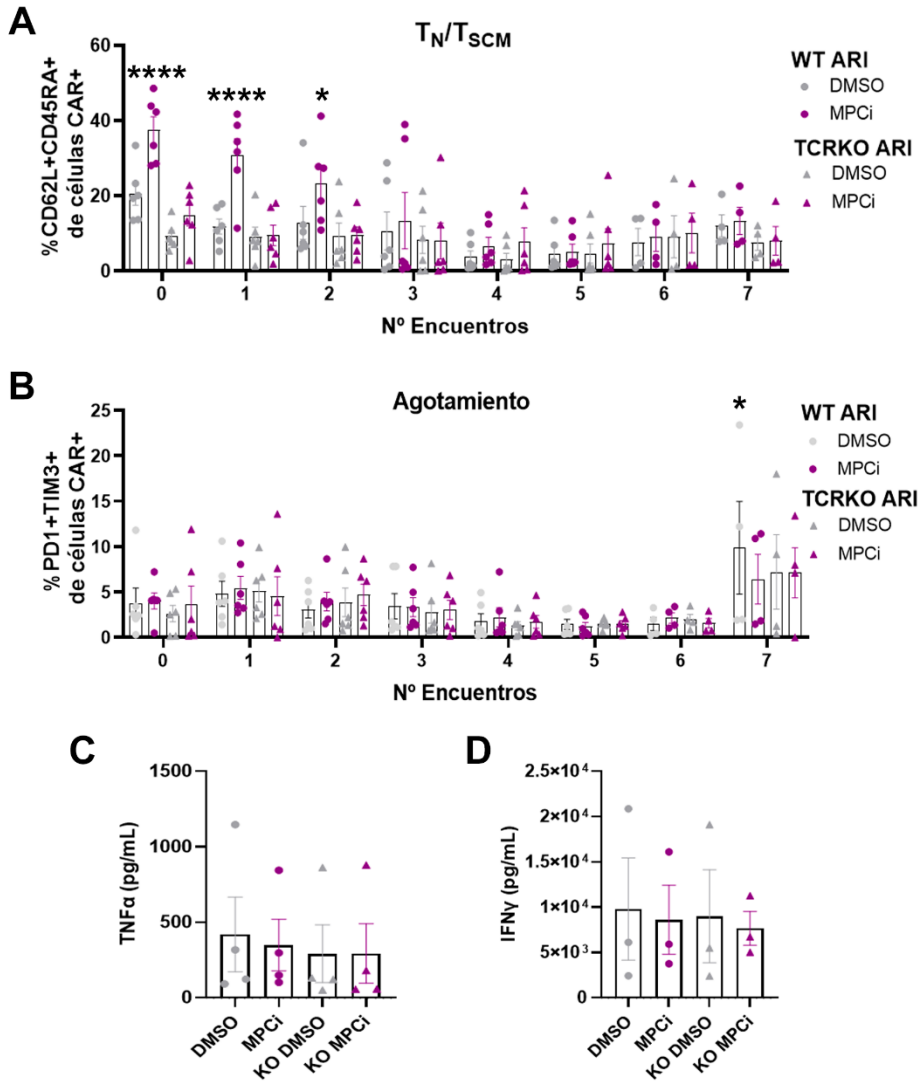


Figura 33. Fenotipo de las células TCRKO ARI moduladas metabólicamente y estimuladas continuamente con las células diana. (A) Porcentaje de células T_N/T_{SCM} de las células WT ARI y TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi tras los diferentes encuentros con las células Namalwa (6 donantes independientes, n=6). **(B)** Porcentaje de células PD1+TIM3+ de las células WT ARI y TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi tras los diferentes encuentros con las células Namalwa (6 donantes independientes, n=6). **(C)** Secreción de las citoquinas efectoras TNF α e **(D)** IFN γ por parte de las células CAR-T moduladas metabólicamente en respuesta a las células diana tras 24h de co-cultivo (4 donantes independientes, n=4). Las gráficas muestran la media \pm SEM (6 donantes independientes, n=6). La estadística se basa en un test two-way ANOVA multiple comparisons, *p<0,05, ****p<0,001.

Por último, estudiamos la actividad antitumoral de las células ARI-CAR-T tratadas con el inhibidor de MPC en un modelo pancreático metastásico el cual había sido modificado previamente para expresar la proteína CD19 humana en su superficie de manera heterogénea. En concreto, se generó la línea celular MiaPaca 70% CD19+, la cual se co-cultivó en un ratio E:D 2:1 con las células TCRKO ARI y WT ARI que habían sido expandidas *ex vivo* durante 10 días en presencia del inhibidor de MPC o DMSO (**Figura 34A**). Interesantemente y al contrario de lo que ocurría en el modelo de Namalwa, únicamente las células TCRKO ARI tratadas con MPCi vieron incrementada su actividad antitumoral en comparación con las controles. Mientras que células WT ARI perdían actividad antitumoral frente a las células MiaPaca al cuarto encuentro en ausencia o presencia de MPCi (**Figura 34B**), las células TCRKO ARI pre-tratadas con el inhibidor de MPC (y no las controles) controlaron el crecimiento de las células tumorales (**Figura 34C**). Este incremento en la actividad lítica de las TCRKO ARI en este modelo se correlaciona con un incremento en la población T_N/T_{SCM} tras el tratamiento con MPCi (**Figura 34D**). Sin embargo, este incremento en la población T_N/T_{SCM} también se observa en las células WT ARI a pesar de no verse un incremento significativo en la actividad lítica. Si analizamos el estado de agotamiento de las células CAR+, observamos que la mayor eficacia lítica obtenida con las células TCRKO ARI pre-tratadas con el inhibidor MPCi tras el tercer encuentro se relaciona con una menor co-expresión de los marcadores de agotamiento PD1 y LAG3 en comparación con las células control (**Figura 34E**).

En resumen, todos estos datos demuestran que el tratamiento con el inhibidor para MPC mejora el fenotipo de las células CAR-T en todas las condiciones analizadas. No obstante, el efecto final en la mejora de su actividad antitumoral varía en función del modelo utilizado.

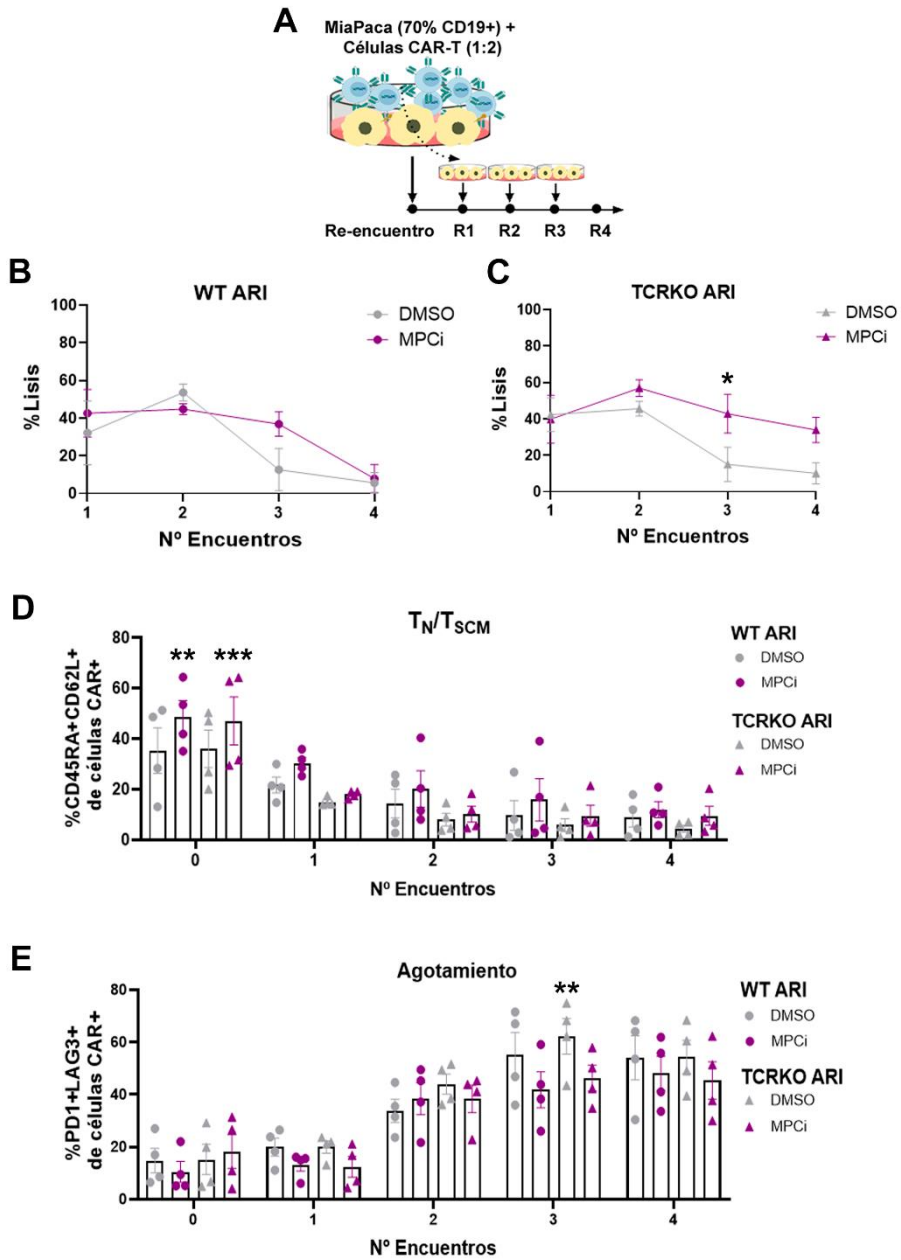


Figura 34. Potencia efectora de las células TCRKO ARI tras una exposición frecuente con el antígeno tumoral en un modelo de carcinoma pancreático. (A) Esquema del ensayo de lisis seriada. Las células CAR-T tratadas con los inhibidores durante 10 días, fueron lavadas y co-cultivadas con las células MiaPaca CD19+ (E:D = 2:1) y se re-estimularon cada día. **(B)** Porcentaje de lisis tras cada encuentro (24h) de las células WT ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi. **(C)** Porcentaje de lisis tras cada encuentro (24h) de las células TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi. **(D)** Porcentaje de células T_N/T_{SCM} de las células WT ARI y TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi tras los diferentes

encuentros con las células MiaPaca. **(F)** Porcentaje de células PD1+LAG3+ de las células WT ARI y TCRKO ARI pre-tratadas con DMSO o MPCi tras los diferentes encuentros con las células MiaPaca. Las gráficas muestran la media \pm SEM (4 donantes independientes, n=4). La estadística se basa en un test two-way ANOVA multiple comparisons, **p<0,01, ***p<0,005.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Existen diferentes productos basados en células T modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) aprobados para el tratamiento de pacientes con neoplasias de células B recidivantes o refractarias. Sin embargo, el acceso a esta terapia está limitado por varias barreras asociadas principalmente al proceso de fabricación. Un estudio ha publicado que entre un 10-30% de los pacientes que han participado en los ensayos JULIET, TRASCEND y ZUMA-1 sufrieron leucoféresis pero no recibieron la terapia CAR-T principalmente debido a los tiempos de espera para generar los productos (Westin et al., 2021). Este tiempo de espera está asociado a una fabricación centralizada, por lo que las infraestructuras y recursos son limitados. Además, la composición del material de partida (calidad y cantidad de las células T) de pacientes con cáncer es muy variable, influenciada por la edad del paciente y los defectos debidos a la enfermedad subyacente o al tratamiento previo con agentes linfotóxicos. Por ejemplo, las concentraciones de células T memoria en pacientes con LLA y linfoma no Hodgkin disminuyen con cada ciclo de tratamiento estándar (Singh et al., 2016). Por otro lado, muchos de los pacientes con LLC presentan células T agotadas, con reducida capacidad para expandirse, de ahí la baja eficacia terapéutica de las células CAR-T en esta enfermedad (Fraiatta, Lacey, et al., 2018).

La principal estrategia para solventar algunos de estos inconvenientes consiste en la fabricación de células CAR-T alogénicas “listas para usar”. Dado que las células de donantes sanos no han sido expuestas a quimioterapias y están libres de células tumorales, se espera que su calidad sea superior a las obtenidas de pacientes con cáncer. De hecho, varios estudios han demostrado una funcionalidad superior de células CAR-T obtenidas de donantes sanos en comparación con células CAR-T derivadas de pacientes en modelos *in vivo* (Arcangeli et al., 2020; Fraietta, Lacey, et al., 2018), incluso aquellas obtenidas de pacientes no tratados (Hoffmann et al., 2017).

Las técnicas asociadas a la generación de células CAR-T alogénicas son las mismas que las descritas para la producción de células CAR-T autólogas (selección, activación e ingeniería genética de células T). Las estrategias basadas en células CAR-T alogénicas, por el contrario, pueden tratar potencialmente a cientos de pacientes a partir de un solo lote de células CAR-T, en lugar de tener que hacer una terapia individualizada para cada paciente. También se pueden usar en esa fracción considerable de pacientes cuyas propias células T no pueden expandirse lo suficiente como para producir una terapia CAR-T autóloga viable. Además, es más factible repetir el tratamiento en caso de recaída.

A pesar de estas ventajas, las células CAR-T alogénicas presentan algunos inconvenientes, como son la necesidad de evitar la enfermedad de injerto contra huésped, intensificar los regímenes de linfodepleción y una limitada persistencia *in vivo* de las células CAR-T (con una media de 42 días en el paciente, (Benjamin et al., 2020)).

Por lo tanto, en la presente tesis nos planteamos el desarrollo de una plataforma para la generación de células CAR-T a partir de células de donantes sanos que ponga solución a parte de dichos problemas.

Eficacia y seguridad de las células ARI-CAR-T universales para el tratamiento de linfomas tipo B

En primer lugar, demostramos la viabilidad de generar células CAR-T alogénicas universales mediante la eliminación de la expresión del receptor de células $T\alpha\beta$ (TCRKO) usando la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9. La elección de esta tecnología se basa en la alta actividad y eficiencia de la nucleasa Cas9 así como en la facilidad de diseño y aplicación. Previamente a la edición, realizamos la introducción del CAR mediante vectores lentivirales. En concreto, utilizamos un CAR α CD19 de segunda generación (ARI-0001) conteniendo el dominio de co-estimulación 4-1BB y de activación CD3z.

ARI-0001 es un medicamento CAR-T académico desarrollado por el Hospital Clínic de Barcelona y aprobado para exención hospitalaria por la AEMPS para el tratamiento de la LLA-B en pacientes mayores de 25

años. Esta terapia CAR-T autóloga ha dado resultados comparables con otros productos CAR-T α CD19 (Ortiz-Maldonado et al., 2021) en pacientes que no cumplían los requisitos para el tratamiento con los productos comerciales. La posibilidad de administración de ARI-0001 bajo exención hospitalaria ofrece la oportunidad de desarrollar la terapia CAR-T en estrecho contacto con la práctica clínica y un rápido acceso de los pacientes a la misma. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la fabricación específica de un producto para cada paciente es costosa, requiere mucho tiempo y genera un producto heterogéneo, y no en todos los casos es posible generar el producto final. La generación de células ARI-0001 utilizando células de donantes sanos aumentaría el número de pacientes que podrían acceder al tratamiento. No obstante, el riesgo de EICH debe evitarse para que estas células sean lo suficientemente seguras para que puedan ser consideradas para uso clínico.

Una de las estrategias más eficientes se basa en la eliminación de la expresión del TCR. Otra alternativa sería el uso de células CAR-T derivadas de sangre de cordón umbilical, células CAR-T virus-específicas, células CAR-T $\gamma\delta$, células CAR-NK o células CAR-NKT de donantes sanos (Cutmore & Marshall, 2021). El hecho de que la transfusión adoptiva de células NK se haya relacionado raramente con eventos de EICH (Olson et al., 2010) y la viabilidad de varias fuentes para obtener células NK (Heipertz et al., 2021) postulan a las células CAR-NK como una alternativa interesante para el producto universal. Sin embargo, todavía existen varias barreras para el éxito clínico de las células CAR-NK, como la baja eficiencia de transducción y/o la persistencia y expansión *in vivo* limitadas (Heipertz et al., 2021).

La edición genómica se ha convertido en una herramienta excepcional para alterar específicamente la expresión de un gen de interés tanto para fines clínicos como para investigación. Por lo general, estas herramientas generan una rotura de doble cadena de ADN (DSB) específica de sitio, la cual se repara principalmente mediante la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Kim & Kim, 2014), la cual es propensa a errores y comúnmente genera *indels* pequeños (<50 pb). No obstante, también

pueden generar genotoxicidad no deseada, como es la creación de cortes fuera de diana (*off-targets*) o translocaciones en casos de edición múltiple, que deben analizarse en detalle. Además, en el caso de la tecnología CRISPR/Cas9, estudios recientes han mostrado una frecuencia relativamente alta de grandes deleciones tras el corte en los sitios diana en diferentes tipos celulares (Adikusuma et al., 2018; Hoijer et al., 2022; Kosicki et al., 2018; Song et al., 2020; Wen et al., 2021; Wen & Zhang, 2022; Wu et al., 2022). Esto indica que las vías de reparación del ADN distintas de NHEJ juegan un papel importante en la reparación de DSBs.

En este trabajo detectamos la generación de grandes deleciones tras la edición del locus *TRAC* que oscilan entre 2 y 3 kb de tamaño, un fenómeno inexplorado en el campo de células CAR-T hasta hace muy poco (Wu et al., 2022). Alrededor de un tercio de las grandes deleciones analizadas contenían microhomologías en el sitio de rotura. Esto sugiere la participación de la vía de unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ) como mecanismo potencial de estas grandes deleciones, como se ha informado anteriormente (Bae et al., 2014; Kosicki et al., 2022; Owens et al., 2019). Las grandes deleciones pueden tener efectos nocivos en los genes cercanos si afectan a las regiones reguladoras. Sin embargo, las consecuencias no se limitan a la zona diana ya que estas deleciones pueden ser fuentes importantes de inestabilidad genómica. Estos posibles efectos negativos resaltan la importancia de una genotipificación extensiva para detectar con precisión posibles alteraciones en células destinadas al tratamiento de pacientes. En los últimos años varios grupos han identificado las grandes deleciones como un potencial riesgo genotóxico y han propuesto alternativas diferentes para reducirlo. Wen y cols., (Wen et al., 2021) demostraron que la frecuencia de grandes deleciones depende del sitio diana y del tipo de célula, siendo las células T primarias humanas particularmente propensas a estos efectos genotóxicos. También demostraron que con la provisión de un ADN molde la reparación dirigida por homología (HR) redujo sustancialmente las grandes deleciones.

La edición del gen *TCR* suele realizarse a tiempos cortos de cultivo de las células T, momento en el cual la cromatina de las células T podría ser más accesible y en el que la maquinaria de recombinación del propio *TCR* podría ser más activa (RAG). Sin embargo, en nuestra mano no observamos cambios significativos ni en la eficacia ni en la seguridad de edición entre células expandidas y no expandidas cuando la EG se realiza en condiciones óptimas. Otra alternativa para evitar la generación de grandes deleciones es el uso de editores de base para eliminar el *TCR* (Song et al., 2020).

A pesar de los efectos genotóxicos potenciales de CRISPR/Cas9, hemos mostrado evidencia de que la interrupción del locus *TRAC* no altera significativamente la funcionalidad de las células T ni de las células CAR-T. De hecho, nuestros datos detectan alteraciones fenotípicas mínimas en las células TCRKO ARI en comparación con las células ARI no editadas (WT ARI) en estado de reposo, después de repetidas estimulaciones *in vitro*, así como en un modelo xenogénico murino. Además, nuestros estudios acerca del metabolismo mitocondrial confirmaron la ausencia de efectos importantes en la actividad metabólica de las células CAR-T después de la edición del locus *TRAC*. Aunque es necesario realizar estos estudios con mayor número de donantes y bajo diferentes condiciones para llegar a una conclusión más robusta.

Como era de esperar, la eliminación del *TCR* en las células ARI eliminó por completo la capacidad de respuesta alogénica mientras mantenían una actividad antitumoral *ex vivo* o *in vivo* similar a las células WT ARI. Por un lado, estos resultados contrastan con lo descrito por los autores Stenger y Li., cuyos trabajos sostienen que el *TCR* endógeno promueve la persistencia *in vivo* de las células CAR-T anti-CD19 (W. Li et al., 2022; Stenger et al., 2020). Pero por otro, nuestros resultados confirman otros trabajos en los que la supervivencia de ratones inoculados con células tumorales CD19+ fue similar tras el tratamiento con células TCRKO o WT CAR-T (Graham et al., 2021; Tipanee et al., 2022). Cabe destacar que, después de la expansión *in vivo*, las células WT y TCRKO ARI presentaron un fenotipo T_{EM} predominante, pero mantuvieron un porcentaje sustancial (10-20 %) de células T menos diferenciadas, $T_N/T_{SCM} + T_{CM}$.

En resumen, a pesar de los riesgos potenciales derivados de la generación de grandes deleciones utilizando el sistema CRISPR/Cas9, todos los datos generados durante esta tesis indican una buena relación seguridad/riesgo del uso de células ARI-CAR-T universales, con ausencia de alteraciones fenotípicas. Por lo tanto, proponemos las células TCRKO ARI generadas con CRISPR/Cas9 como un nuevo medicamento de terapia avanzada (ATMP) alogénico para el tratamiento de linfomas de células B recidivantes y/o refractarios que no cumplen los requisitos para recibir la terapia CAR-T autóloga.

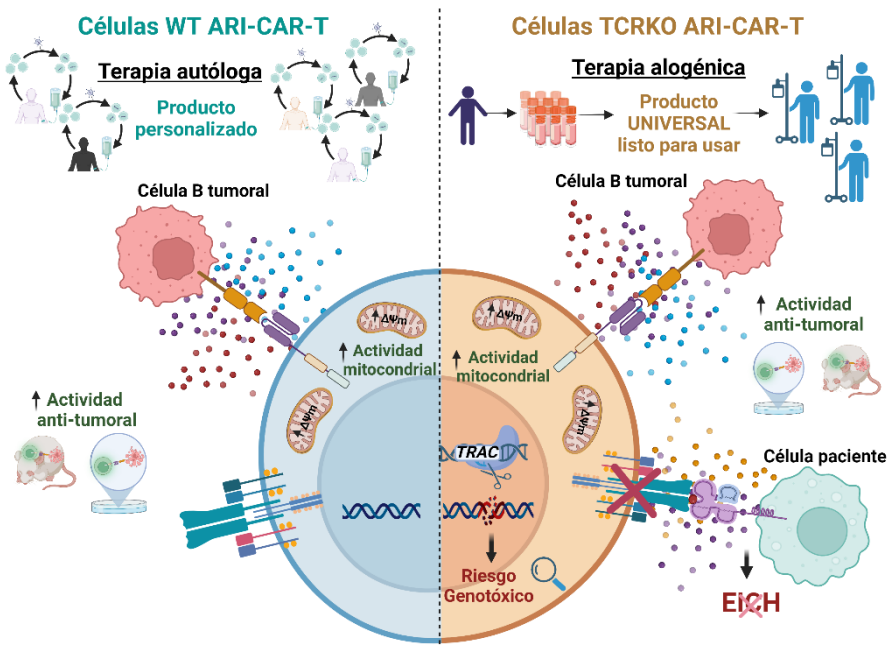


Figura 35. Representación gráfica de los resultados obtenidos al comparar las células ARI-CAR-T y TCRKO ARI-CAR-T.

La inhibición transitoria de ciertas rutas metabólicas mejora las características de las células ARI-CAR-T universales

La eficacia de la terapia CAR-T depende en gran medida de la expansión de las células T y de su persistencia a largo plazo. Una persistencia insuficiente constituye una barrera importante en el desarrollo de las terapias CAR-T alogénicas universales. Estas cualidades están ligadas estrechamente al fenotipo del producto infundido. Por ejemplo, la proporción de una población específica de células T memoria

(CD8+CD27+PD1) se ha correlacionado con un estado de remisión en pacientes con LLC tratados con células CAR-T (Fraieta, Lacey, et al., 2018). Similarmente, la cantidad de células T con un fenotipo CD8+CCR7+CD27+ fue tres veces mayor en el producto de infusión de pacientes con linfoma de células B que lograron una respuesta completa, en comparación con lo que presentaron recaídas (Deng et al., 2020). De forma más genérica, varios estudios han publicado que la proporción de células T madre memoria (T_{SCM}), en el producto CAR-T correlaciona positivamente con la expansión y persistencia *in vivo* y, por tanto, con una remisión a largo plazo (Arcangeli et al., 2022; Arcangeli et al., 2020; Biasco et al., 2021; Chen et al., 2021; Engels et al., 2021).

Se han llevado a cabo diferentes estrategias para conseguir esta mejora de la eficacia terapéutica de las células CAR-T, como son la selección física de una población T memoria definida, la optimización en el diseño del CAR y su expresión, o la modificación de los protocolos de expansión.

Dado que el metabolismo de las células T está estrechamente ligado a la diferenciación fenotípica, nos planteamos que la intervención metabólica durante la expansión *ex vivo* de las células CAR-T podría ser una buena estrategia para inducir un fenotipo memoria y mejorar su eficacia terapéutica. Además, la traslación a clínica sería más fácil, sobre todo si usamos moléculas ya aprobadas para uso clínico.

La idea de una intervención farmacológica para reprogramar a las células T para terapia celular adoptiva (TCA) ha cobrado importancia desde que se demostró que la rapamicina, al inhibir mTOR en las células T activadas, podría aumentar la proporción de células T de memoria durante la respuesta primaria a una infección viral (Araki et al., 2009). Posteriormente, se ha demostrado que los inhibidores para Akt (Klebanoff et al., 2017) y PI3K δ (Abu Eid et al., 2017) tienen un efecto similar al promover la diferenciación de células T memoria, aumentar la expansión y/o la persistencia en la TCA y mejorar el potencial antitumoral en entornos terapéuticos.

Durante mi estancia en el laboratorio del Prof. Pedro Romero demostramos que la captación de piruvato a través de su transportador mitocondrial (MPC), así como la carboxilación reductiva de glutamina mediada por la enzima mitocondrial isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) tienen un impacto en la diferenciación y función de células T. La inhibición de estas rutas conduce a cambios en la concentración de metabolitos que intervienen en el ciclo de Krebs. Esto se asocia a una reprogramación epigenética que promueve la diferenciación a células T memoria sin comprometer su capacidad de proliferación y funcionalidad (Wenes et al., 2022) (Jaccard et al, 2022, en revisión).

Durante este periodo, además, comprobamos que el efecto de la intervención metabólica estaba estrechamente ligado al estado de diferenciación de las células T. Observamos que el inhibidor del transportador de piruvato mitocondrial (MPCi) perdía la capacidad de inducir una población memoria en células T WT y TCRKO si la intervención se realizaba varios días tras la activación de las células T. Esto sugiere que ciertas rutas metabólicas de las células T no son reversibles una vez se han puesto en marcha.

De manera que cuando decidimos probar el efecto de estos inhibidores en nuestros cultivos de células ARI-CAR-T, realizamos la intervención justo en el momento de activación de las células T. Sorprendentemente, bajo condiciones de cultivo más próximas a los protocolos clínicos, el tratamiento de las células WT ARI y TCRKO ARI con el inhibidor para IDH2 (IDH2i, AG221) no indujo un fenotipo memoria. Sí que se indujo eficientemente la población T_N/T_{SCM} en células WT ARI y TCRKO ARI tratadas con el MPCi (UK5099). La inhibición de MPC no comprometió la expansión de las células CAR T ni la producción de citoquinas.

La inhibición transitoria de MPC aumentó significativamente la actividad antitumoral de las células WT ARI en un modelo *in vitro* de linfoma, manteniendo un fenotipo memoria tras los diferentes encuentros con el antígeno. Sin embargo, en un modelo *in vitro* de carcinoma pancreático fueron las células TCRKO ARI pre-tratadas con el MPCi las que controlaron más eficientemente el crecimiento tumoral. Esta mejora en

la eficacia se correlaciona con un mejor estado fenotípico de las células CAR-T. Esto sugiere que los mecanismos subyacentes que empujan los cambios metabólicos y transcripcionales se reprograman únicamente bajo ciertas circunstancias. En un modelo *in vivo*, donde existe un ambiente más estresante e inmunosupresor, quizás estos mecanismos sean más imprescindibles para una eliminación eficiente del tumor.

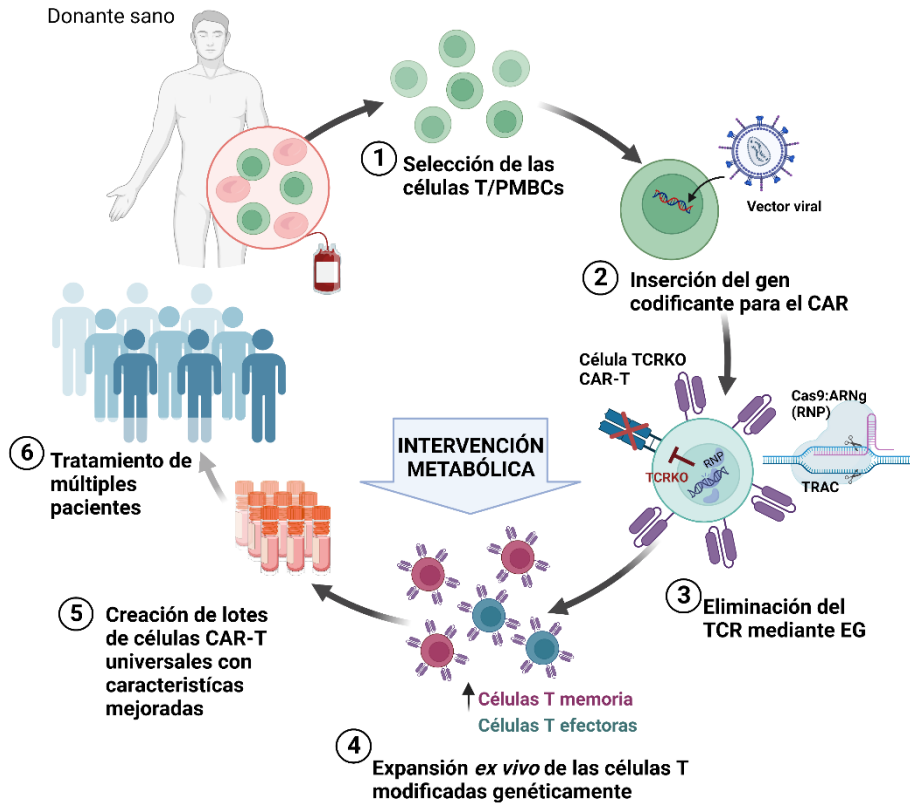


Figura 36. Proceso para implementar la terapia adoptiva con células CAR-T alogénicas universales moduladas metabólicamente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La combinación de CRISPR/Cas9 como ribonucleopartícula (RNP) y de vectores lentivirales (VLs) permite la generación eficiente de células ARI-CAR-T universales de potencial utilidad clínica.
2. La edición del *TRAC* con CRISPR/Cas9 en células T primarias genera grandes deleciones en este locus y, por lo tanto, es importante monitorizar su presencia en productos TCRKO CAR-T.
3. La interrupción del TCR no tiene efecto significativo sobre la actividad antitumoral de las células ARI-CAR-T en un modelo de linfoma.
4. El efecto de la inhibición del transportador mitocondrial de piruvato (MPC) y la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH2) en células CAR-T depende de las condiciones y modelos utilizados.
5. El inhibidor de MPC mejora el fenotipo y la actividad antitumoral de las células ARI-CAR-T por lo que podría utilizarse para mejorar su fabricación.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The combination of CRISPR/Cas9 as ribonucleoprotein (RNP) and lentiviral vectors (LVs) allows efficient generation of universal Off-the-shelf ARI-CAR-T cells with clinical potential.
2. *TRAC* edition with CRISPR/Cas9 in primary human T cells generates large deletions in this locus and it is therefore important to monitor its presence in TCRKO CAR-T products.
3. TCR disruption has no significant effect on the antitumor activity of ARI-CAR-T cells in a lymphoma model.
4. The effect of mitochondrial pyruvate transporter (MPC) and enzyme isocitrate dehydrogenase (IDH2) inhibition in CAR-T cells depends on the conditions and models used.
5. The MPC improved phenotype and antitumoral activity of ARI-CAR-T cells and therefore could be used to improve their manufacturing.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abramson, J. S., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D. G., Andreadis, C., Sehgal, A., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Garcia, J., Kostic, A., Mallaney, M., Ogasawara, K., Newhall, K., . . . Siddiqi, T. (2020). Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*, 396(10254), 839-852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0)
- Abu Eid, R., Ahmad, S., Lin, Y., Webb, M., Berrong, Z., Shrimali, R., Kumai, T., Ananth, S., Rodriguez, P. C., Celis, E., Janik, J., Mkrtychyan, M., & Khleif, S. N. (2017). Enhanced Therapeutic Efficacy and Memory of Tumor-Specific CD8 T Cells by Ex Vivo PI3K-delta Inhibition. *Cancer Res*, 77(15), 4135-4145. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1925>
- Abu Eid, R., Friedman, K. M., Mkrtychyan, M., Walens, A., King, W., Janik, J., & Khleif, S. N. (2015). Akt1 and -2 inhibition diminishes terminal differentiation and enhances central memory CD8(+) T-cell proliferation and survival. *Oncoimmunology*, 4(5), e1005448. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1005448>
- Adami, A., & Maher, J. (2021). An overview of CAR T-cell clinical trial activity to 2021. *Immunother Adv*, 1(1), Itab004. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltab004>
- Adikusuma, F., Piltz, S., Corbett, M. A., Turvey, M., McColl, S. R., Helbig, K. J., Beard, M. R., Hughes, J., Pomerantz, R. T., & Thomas, P. Q. (2018). Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature*, 560(7717), E8-E9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0380-z>
- Ajina, A., & Maher, J. (2018). Strategies to Address Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling. *Mol Cancer Ther*, 17(9), 1795-1815. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1097>
- Alvarez-Fernandez, C., Escriba-Garcia, L., Vidal, S., Sierra, J., & Briones, J. (2016). A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy. *J Transl Med*, 14(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0973-y>
- Amberger, M., & Ivics, Z. (2020). Latest Advances for the Sleeping Beauty Transposon System: 23 Years of Insomnia but Prettier than Ever: Refinement and Recent Innovations of the Sleeping Beauty Transposon System Enabling Novel, Nonviral Genetic Engineering Applications. *Bioessays*, 42(11), e2000136. <https://doi.org/10.1002/bies.202000136>
- Amirache, F., Levy, C., Costa, C., Mangeot, P. E., Torbett, B. E., Wang, C. X., Negre, D., Cosset, F. L., & Verhoeyen, E. (2014). Mystery solved: VSV-

- G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood*, 123(9), 1422-1424. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-540641>
- Andrews, L. P., Yano, H., & Vignali, D. A. A. (2019). Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups. *Nat Immunol*, 20(11), 1425-1434. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0512-0>
- Araki, K., Turner, A. P., Shaffer, V. O., Gangappa, S., Keller, S. A., Bachmann, M. F., Larsen, C. P., & Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, 460(7251), 108-112. <https://doi.org/10.1038/nature08155>
- Arcangeli, S., Bove, C., Mezzanotte, C., Camisa, B., Falcone, L., Manfredi, F., Bezecchi, E., El Khoury, R., Norata, R., Sanvito, F., Ponzoni, M., Greco, B., Moresco, M. A., Carrabba, M. G., Ciceri, F., Bonini, C., Bondanza, A., & Casucci, M. (2022). CAR T cell manufacturing from naive/stem memory T lymphocytes enhances antitumor responses while curtailing cytokine release syndrome. *J Clin Invest*, 132(12). <https://doi.org/10.1172/JCI150807>
- Arcangeli, S., Falcone, L., Camisa, B., De Girardi, F., Biondi, M., Giglio, F., Ciceri, F., Bonini, C., Bondanza, A., & Casucci, M. (2020). Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Front Immunol*, 11, 1217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01217>
- Atkins, A., Chung, C. H., Allen, A. G., Dampier, W., Gurrola, T. E., Sariyer, I. K., Nonnemacher, M. R., & Wigdahl, B. (2021). Off-Target Analysis in Gene Editing and Applications for Clinical Translation of CRISPR/Cas9 in HIV-1 Therapy. *Front Genome Ed*, 3, 673022. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.673022>
- Bae, S., Kweon, J., Kim, H. S., & Kim, J. S. (2014). Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat Methods*, 11(7), 705-706. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3015>
- Benjamin, R., Graham, C., Yallop, D., Jozwik, A., Mirci-Danicar, O. C., Lucchini, G., Pinner, D., Jain, N., Kantarjian, H., Boissel, N., Maus, M. V., Frigault, M. J., Baruchel, A., Mohty, M., Gianella-Borradori, A., Binlich, F., Balandraud, S., Vitry, F., Thomas, E., . . . Group, U. (2020). Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies. *Lancet*, 396(10266), 1885-1894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32334-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32334-5)
- Biasco, L., Izotova, N., Rivat, C., Ghorashian, S., Richardson, R., Guvenel, A., Hough, R., Wynn, R., Popova, B., Lopes, A., Pule, M., Thrasher, A. J., & Amrolia, P. J. (2021). Clonal expansion of T memory stem cells determines early anti-leukemic responses and long-term CAR T cell

- persistence in patients. *Nat Cancer*, 2(6), 629-642. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00207-7>
- Biffi, A., Bartolomae, C. C., Cesana, D., Cartier, N., Aubourg, P., Ranzani, M., Cesani, M., Benedicenti, F., Plati, T., Rubagotti, E., Merella, S., Capotondo, A., Sgualdino, J., Zanetti, G., von Kalle, C., Schmidt, M., Naldini, L., & Montini, E. (2011). Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood*, 117(20), 5332-5339. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306761>
- Bishop, D. C., Clancy, L. E., Simms, R., Burgess, J., Mathew, G., Moezzi, L., Street, J. A., Sutrave, G., Atkins, E., McGuire, H. M., Gloss, B. S., Lee, K., Jiang, W., Maddock, K., McCaughan, G., Avdic, S., Antonenas, V., O'Brien, T. A., Shaw, P. J., . . . Micklethwaite, K. P. (2021). Development of CAR T-cell lymphoma in 2 of 10 patients effectively treated with piggyBac-modified CD19 CAR T cells. *Blood*, 138(16), 1504-1509. <https://doi.org/10.1182/blood.2021010813>
- Blagih, J., Coulombe, F., Vincent, E. E., Dupuy, F., Galicia-Vazquez, G., Yurchenko, E., Raissi, T. C., van der Windt, G. J., Viollet, B., Pearce, E. L., Pelletier, J., Piccirillo, C. A., Krawczyk, C. M., Divangahi, M., & Jones, R. G. (2015). The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity*, 42(1), 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.030>
- Blank, C. U., Haining, W. N., Held, W., Hogan, P. G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R. C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N. P., Schietinger, A., Schumacher, T. N., Schwartzberg, P. L., Sharpe, A. H., Speiser, D. E., Wherry, E. J., Youngblood, B. A., & Zehn, D. (2019). Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol*, 19(11), 665-674. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0221-9>
- Bonini, C., Brenner, M. K., Heslop, H. E., & Morgan, R. A. (2011). Genetic modification of T cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17(1 Suppl), S15-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.09.019>
- Bowers, J. S., Majchrzak, K., Nelson, M. H., Aksoy, B. A., Wyatt, M. M., Smith, A. S., Bailey, S. R., Neal, L. R., Hammerbacher, J. E., & Paulos, C. M. (2017). PI3Kdelta Inhibition Enhances the Antitumor Fitness of Adoptively Transferred CD8(+) T Cells. *Front Immunol*, 8, 1221. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01221>
- Bozza, M., De Roia, A., Correia, M. P., Berger, A., Tuch, A., Schmidt, A., Zornig, I., Jager, D., Schmidt, P., & Harbottle, R. P. (2021). A nonviral, nonintegrating DNA nanovector platform for the safe, rapid, and persistent manufacture of recombinant T cells. *Sci Adv*, 7(16). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf1333>
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, G. J., Chen, Q., Huang,

- S. C., O'Neill, C. M., Edelson, B. T., Pearce, E. J., Sesaki, H., Huber, T. B., Rambold, A. S., & Pearce, E. L. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*, *166*(1), 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035>
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., & Pearce, E. L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med*, *212*(9), 1345-1360. <https://doi.org/10.1084/jem.20151159>
- Burton, J., Siller-Farfan, J. A., Pettmann, J., Salzer, B., Kutuzov, M., van der Merwe, P. A., & Dushek, O. (2023). Inefficient exploitation of accessory receptors reduces the sensitivity of chimeric antigen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *120*(2), e2216352120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2216352120>
- Byrd, J. C., Furman, R. R., Coutre, S. E., Flinn, I. W., Burger, J. A., Blum, K. A., Grant, B., Sharman, J. P., Coleman, M., Wierda, W. G., Jones, J. A., Zhao, W., Heerema, N. A., Johnson, A. J., Sukbuntherng, J., Chang, B. Y., Clow, F., Hedrick, E., Buggy, J. J., . . . O'Brien, S. (2013). Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, *369*(1), 32-42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215637>
- Cai, C., Tang, D., Han, Y., Shen, E., Abdihamid, O., Guo, C., Shen, H., & Zeng, S. (2020). A comprehensive analysis of the fatal toxic effects associated with CD19 CAR-T cell therapy. *Aging (Albany NY)*, *12*(18), 18741-18753. <https://doi.org/10.18632/aging.104058>
- Cai, Z., Kishimoto, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., & Sprent, J. (1997). Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8+ T cells. *J Exp Med*, *185*(4), 641-651. <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.641>
- Cantrell, D. (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol*, *14*, 259-274. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.259>
- Cappell, K. M., & Kochenderfer, J. N. (2021). A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol*, *18*(11), 715-727. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00530-z>
- Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A. M., & Frauwirth, K. A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol*, *185*(2), 1037-1044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903586>
- Castella, M., Boronat, A., Martin-Ibanez, R., Rodriguez, V., Sune, G., Caballero, M., Marzal, B., Perez-Amill, L., Martin-Antonio, B., Castano, J., Bueno, C., Balague, O., Gonzalez-Navarro, E. A., Serra-Pages, C., Engel, P., Vilella, R., Benitez-Ribas, D., Ortiz-Maldonado, V., Cid, J., . . . Juan, M. (2019). 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*, 12, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.11.010>
- Castella, M., Caballero-Banos, M., Ortiz-Maldonado, V., Gonzalez-Navarro, E. A., Sune, G., Antonana-Vidosola, A., Boronat, A., Marzal, B., Millan, L., Martin-Antonio, B., Cid, J., Lozano, M., Garcia, E., Tabera, J., Trias, E., Perpina, U., Canals, J. M., Baumann, T., Benitez-Ribas, D., . . . Juan, M. (2020). 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*, 11, 482. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00482>
- Cavazza, A., Moiani, A., & Mavilio, F. (2013). Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis. *Hum Gene Ther*, 24(2), 119-131. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.203>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*, 26(1), 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Chamberlain, C. A., Bennett, E. P., Kverneland, A. H., Svane, I. M., Donia, M., & Met, O. (2022). Highly efficient PD-1-targeted CRISPR-Cas9 for tumor-infiltrating lymphocyte-based adoptive T cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*, 24, 417-428. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.01.004>
- Chang, C. H., & Pearce, E. L. (2016). Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. *Nat Immunol*, 17(4), 364-368. <https://doi.org/10.1038/ni.3415>
- Chaoul, N., Fayolle, C., Desrues, B., Oberkamp, M., Tang, A., Ladant, D., & Leclerc, C. (2015). Rapamycin Impairs Antitumor CD8+ T-cell Responses and Vaccine-Induced Tumor Eradication. *Cancer Res*, 75(16), 3279-3291. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0454>
- Chen, G. M., Chen, C., Das, R. K., Gao, P., Chen, C. H., Bandyopadhyay, S., Ding, Y. Y., Uzun, Y., Yu, W., Zhu, Q., Myers, R. M., Grupp, S. A., Barrett, D. M., & Tan, K. (2021). Integrative Bulk and Single-Cell Profiling of Premanufacture T-cell Populations Reveals Factors Mediating Long-Term Persistence of CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov*, 11(9), 2186-2199. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1677>
- Chen, J. Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P., & Yager, J. D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim Biophys Acta*, 1793(10), 1540-1570. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.06.001>
- Cheng, J., Phong, B., Wilson, D. C., Hirsch, R., & Kane, L. P. (2011). Akt fine-tunes NF-kappaB-dependent gene expression during T cell activation. *J Biol Chem*, 286(41), 36076-36085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259549>

- Chmielewski, M., & Abken, H. (2015). TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 15(8), 1145-1154. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1046430>
- Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N., & Chen, J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 2976-2981. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2976>
- Cho, J. H., Collins, J. J., & Wong, W. W. (2018). Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*, 173(6), 1426-1438 e1411. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.038>
- Chowdhury, P. S., Chamoto, K., Kumar, A., & Honjo, T. (2018). PPAR-Induced Fatty Acid Oxidation in T Cells Increases the Number of Tumor-Reactive CD8(+) T Cells and Facilitates Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res*, 6(11), 1375-1387. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0095>
- Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Lupo-Stanghellini, M. T., Mavilio, F., Mondino, A., Bricciato, S., Recchia, A., & Bonini, C. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*, 121(4), 573-584. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431718>
- Cieri, N., Oliveira, G., Greco, R., Forcato, M., Taccioli, C., Cianciotti, B., Valtolina, V., Noviello, M., Vago, L., Bondanza, A., Lunghi, F., Markt, S., Bellio, L., Bordignon, C., Bricciato, S., Peccatori, J., Ciceri, F., & Bonini, C. (2015). Generation of human memory stem T cells after haploidentical T-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 125(18), 2865-2874. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-608539>
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., & Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*, 6, 629-662. <https://doi.org/10.1146/annurev.iv.06.040188.003213>
- Conant, D., Hsiao, T., Rossi, N., Oki, J., Maures, T., Waite, K., Yang, J., Joshi, S., Kelso, R., Holden, K., Enzmann, B. L., & Stoner, R. (2022). Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *CRISPR J*, 5(1), 123-130. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0113>
- Crompton, J. G., Sukumar, M., Roychoudhuri, R., Clever, D., Gros, A., Eil, R. L., Tran, E., Hanada, K., Yu, Z., Palmer, D. C., Kerkar, S. P., Michalek, R. D., Upham, T., Leonardi, A., Acquavella, N., Wang, E., Marincola, F. M., Gattinoni, L., Muranski, P., . . . Restifo, N. P. (2015). Akt inhibition enhances expansion of potent tumor-specific lymphocytes with memory cell characteristics. *Cancer Res*, 75(2), 296-305. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2277>

- Cutmore, L. C., & Marshall, J. F. (2021). Current Perspectives on the Use of off the Shelf CAR-T/NK Cells for the Treatment of Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cancers13081926>
- Dafni, U., Michielin, O., Lluesma, S. M., Tsourti, Z., Polydoropoulou, V., Karlis, D., Besser, M. J., Haanen, J., Svane, I. M., Ohashi, P. S., Kammula, U. S., Orcurto, A., Zimmermann, S., Trueb, L., Klebanoff, C. A., Lotze, M. T., Kandalaft, L. E., & Coukos, G. (2019). Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*, 30(12), 1902-1913. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz398>
- Das, S., & Johnson, D. B. (2019). Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*, 7(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0805-8>
- Davila, M. L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S. S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Fink, M., Shinglot, H., Youssif, M., Satter, M., Wang, Y., Hoseney, J., . . . Brentjens, R. (2014). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 6(224), 224ra225. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008226>
- Delgoffe, G. M., Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Heikamp, E., Meyers, D. J., Horton, M. R., Xiao, B., Worley, P. F., & Powell, J. D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol*, 12(4), 295-303. <https://doi.org/10.1038/ni.2005>
- Deng, Q., Han, G., Puebla-Osorio, N., Ma, M. C. J., Strati, P., Chasen, B., Dai, E., Dang, M., Jain, N., Yang, H., Wang, Y., Zhang, S., Wang, R., Chen, R., Showell, J., Ghosh, S., Patchva, S., Zhang, Q., Sun, R., . . . Green, M. R. (2020). Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas. *Nat Med*, 26(12), 1878-1887. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1061-7>
- Deniger, D. C., Pasetto, A., Tran, E., Parkhurst, M. R., Cohen, C. J., Robbins, P. F., Cooper, L. J., & Rosenberg, S. A. (2016). Stable, Nonviral Expression of Mutated Tumor Neoantigen-specific T-cell Receptors Using the Sleeping Beauty Transposon/Transposase System. *Mol Ther*, 24(6), 1078-1089. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.51>
- Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B. L., Odum, N., & Geisler, C. (1997). Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol*, 138(2), 271-281. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.271>

- Dreger, P., Dohner, H., Ritgen, M., Bottcher, S., Busch, R., Dietrich, S., Bunjes, D., Cohen, S., Schubert, J., Hegenbart, U., Beelen, D., Zeis, M., Stadler, M., Hasenkamp, J., Uharek, L., Scheid, C., Humpe, A., Zenz, T., Winkler, D., . . . German, C. L. L. S. G. (2010). Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood*, *116*(14), 2438-2447. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275420>
- Driessens, G., Zheng, Y., Locke, F., Cannon, J. L., Gounari, F., & Gajewski, T. F. (2011). Beta-catenin inhibits T cell activation by selective interference with linker for activation of T cells-phospholipase C-gamma1 phosphorylation. *J Immunol*, *186*(2), 784-790. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001562>
- Dumauthioz, N., Tschumi, B., Wenes, M., Marti, B., Wang, H., Franco, F., Li, W., Lopez-Mejia, I. C., Fajas, L., Ho, P. C., Donda, A., Romero, P., & Zhang, L. (2021). Enforced PGC-1alpha expression promotes CD8 T cell fitness, memory formation and antitumor immunity. *Cell Mol Immunol*, *18*(7), 1761-1771. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0365-3>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dwyer, C. J., Arhontoulis, D. C., Rangel Rivera, G. O., Knochelmann, H. M., Smith, A. S., Wyatt, M. M., Rubinstein, M. P., Atkinson, C., Thaxton, J. E., Neskey, D. M., & Paulos, C. M. (2020). Ex vivo blockade of PI3K gamma or delta signaling enhances the antitumor potency of adoptively transferred CD8(+) T cells. *Eur J Immunol*, *50*(9), 1386-1399. <https://doi.org/10.1002/eji.201948455>
- Einsele, H., Borghaei, H., Orlowski, R. Z., Subklewe, M., Roboz, G. J., Zugmaier, G., Kufer, P., Iskander, K., & Kantarjian, H. M. (2020). The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. *Cancer*, *126*(14), 3192-3201. <https://doi.org/10.1002/cncr.32909>
- Engels, B., Zhu, X., Yang, J., Price, A., Sohoni, A., Stein, A. M., Parent, L., Greene, M., Niederst, M., Whalen, J., Orlando, E. J., Treanor, L. M., & Brogdon, J. L. (2021). Preservation of T-Cell Stemness with a Novel Expansionless CAR-T Manufacturing Process, Which Reduces Manufacturing Time to Less Than Two Days, Drives Enhanced CAR-T Cell Efficacy. *Blood*, *138*(Supplement 1), 2848-2848. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-146246>
- Escors, D., Bricogne, C., Arce, F., Kochan, G., & Karwacz, K. (2011). On the Mechanism of T cell receptor down-modulation and its physiological

- significance. *J Biosci Med*, 1(1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318485>
- Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S. J., Hamieh, M., Cunanan, K. M., Odak, A., Gonen, M., & Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 543(7643), 113-117. <https://doi.org/10.1038/nature21405>
- Fernandez-Marcos, P. J., & Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*, 93(4), 884S-890. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>
- Fiorenza, S., Ritchie, D. S., Ramsey, S. D., Turtle, C. J., & Roth, J. A. (2020). Value and affordability of CAR T-cell therapy in the United States. *Bone Marrow Transplant*, 55(9), 1706-1715. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-0956-8>
- Fischer, J., Paret, C., El Malki, K., Alt, F., Wingerter, A., Neu, M. A., Kron, B., Russo, A., Lehmann, N., Roth, L., Fehr, E. M., Attig, S., Hohberger, A., Kindler, T., & Faber, J. (2017). CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *J Immunother*, 40(5), 187-195. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000169>
- Fraietta, J. A., Lacey, S. F., Orlando, E. J., Pruteanu-Malinici, I., Gohil, M., Lundh, S., Boesteanu, A. C., Wang, Y., O'Connor, R. S., Hwang, W. T., Pequignot, E., Ambrose, D. E., Zhang, C., Wilcox, N., Bedoya, F., Dorfmeier, C., Chen, F., Tian, L., Parakandi, H., . . . Melenhorst, J. J. (2018). Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*, 24(5), 563-571. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0010-1>
- Fraietta, J. A., Nobles, C. L., Sammons, M. A., Lundh, S., Carty, S. A., Reich, T. J., Cogdill, A. P., Morrissette, J. J. D., DeNizio, J. E., Reddy, S., Hwang, Y., Gohil, M., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Gupta, M., Chen, F., Everett, J. K., Alexander, K. A., Lin-Shiao, E., . . . Melenhorst, J. J. (2018). Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*, 558(7709), 307-312. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0178-z>
- Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 236, 219-242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>
- Fraser, K. A., Schenkel, J. M., Jameson, S. C., Vezys, V., & Masopust, D. (2013). Preexisting high frequencies of memory CD8+ T cells favor rapid memory differentiation and preservation of proliferative potential upon boosting. *Immunity*, 39(1), 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.003>

- Fuertes Marraco, S. A., Soneson, C., Cagnon, L., Gannon, P. O., Allard, M., Abed Maillard, S., Montandon, N., Rufer, N., Waldvogel, S., Delorenzi, M., & Speiser, D. E. (2015). Long-lasting stem cell-like memory CD8⁺ T cells with a naive-like profile upon yellow fever vaccination. *Sci Transl Med*, 7(282), 282ra248. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3700>
- Fujiwara, K., Tsunei, A., Kusabuka, H., Ogaki, E., Tachibana, M., & Okada, N. (2020). Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051182>
- Furger, A., Monks, J., & Proudfoot, N. J. (2001). The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation. *J Virol*, 75(23), 11735-11746. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11735-11746.2001>
- Gardner, R., Finney, O., Brakke, H., Rhea, S., Hicks, R., Doolittle, D., Lopez, M., Orentas, R. J., Li, D., & Jensen, M. C. (2018). Starting T Cell and Cell Product Phenotype Are Associated with Durable Remission of Leukemia Following CD19 CAR-T Cell Immunotherapy. *Blood*, 132, 4022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-117493>
- Gardner, R., Wu, D., Cherian, S., Fang, M., Hanafi, L. A., Finney, O., Smithers, H., Jensen, M. C., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2016). Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 127(20), 2406-2410. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-665547>
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M., & Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 17(10), 1290-1297. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Gattinoni, L., Zhong, X. S., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L. M., Paulos, C. M., Muranski, P., & Restifo, N. P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nat Med*, 15(7), 808-813. <https://doi.org/10.1038/nm.1982>
- Gaudelli, N. M., Lam, D. K., Rees, H. A., Sola-Esteves, N. M., Barrera, L. A., Born, D. A., Edwards, A., Gehrke, J. M., Lee, S. J., Liquori, A. J., Murray, R., Packer, M. S., Rinaldi, C., Slaymaker, I. M., Yen, J., Young, L. E., & Ciaramella, G. (2020). Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat Biotechnol*, 38(7), 892-900. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0491-6>
- Gennert, D. G., Lynn, R. C., Granja, J. M., Weber, E. W., Mumbach, M. R., Zhao, Y., Duren, Z., Sotillo, E., Greenleaf, W. J., Wong, W. H., Satpathy, A. T.,

- Mackall, C. L., & Chang, H. Y. (2021). Dynamic chromatin regulatory landscape of human CAR T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.2104758118>
- Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L., & Grumont, R. J. (2014). NF-kappaB control of T cell development. *Nat Immunol*, 15(1), 15-25. <https://doi.org/10.1038/ni.2785>
- Ghorashian, S., Kramer, A. M., Onuoha, S., Wright, G., Bartram, J., Richardson, R., Albon, S. J., Casanovas-Company, J., Castro, F., Popova, B., Villanueva, K., Yeung, J., Vetharoy, W., Guvenel, A., Wawrzyniecka, P. A., Mekkaoui, L., Cheung, G. W., Pinner, D., Chu, J., . . . Amrolia, P. J. (2019). Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nat Med*, 25(9), 1408-1414. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0549-5>
- Giavridis, T., van der Stegen, S. J. C., Eyquem, J., Hamieh, M., Piersigilli, A., & Sadelain, M. (2018). CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*, 24(6), 731-738. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0041-7>
- Gill, S., & Brudno, J. N. (2021). CAR T-Cell Therapy in Hematologic Malignancies: Clinical Role, Toxicity, and Unanswered Questions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 41, 1-20. https://doi.org/10.1200/EDBK_320085
- Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K., & Mamonkin, M. (2017). Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Rep*, 21(1), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.015>
- Gornaluisse, G. G., Hirata, R. K., Funk, S. E., Riobobos, L., Lopes, V. S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A. G., Hanafi, L. A., Clegg, D. O., Turtle, C., & Russell, D. W. (2017). HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol*, 35(8), 765-772. <https://doi.org/10.1038/nbt.3860>
- Graham, C. E., Jozwik, A., Quartey-Papafio, R., Ioannou, N., Metelo, A. M., Scala, C., Dickson, G., Stewart, O., Almendra-Carrasco, M., Peranzoni, E., Ramsay, A. G., Patten, P. E. M., Pertel, T., Farzaneh, F., Dupouy, S., Pepper, A., & Benjamin, R. (2021). Gene-edited healthy donor CAR T cells show superior anti-tumour activity compared to CAR T cells derived from patients with lymphoma in an in vivo model of high-grade lymphoma. *Leukemia*, 35(12), 3581-3584. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01324-z>
- Grange, M., Buferne, M., Verdeil, G., Leserman, L., Schmitt-Verhulst, A. M., & Auphan-Anezin, N. (2012). Activated STAT5 promotes long-lived cytotoxic CD8+ T cells that induce regression of autochthonous

- melanoma. *Cancer Res*, 72(1), 76-87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2187>
- Greenberg, P. D. (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol*, 49, 281-355. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60778-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60778-6)
- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), 10024-10028. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10024>
- Gubser, P. M., Bantug, G. R., Razik, L., Fischer, M., Dimeloe, S., Hoenger, G., Durovic, B., Jauch, A., & Hess, C. (2013). Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol*, 14(10), 1064-1072. <https://doi.org/10.1038/ni.2687>
- Gudmundsdottir, H., Wells, A. D., & Turka, L. A. (1999). Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol*, 162(9), 5212-5223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227995>
- Gupta, P. K., Godec, J., Wolski, D., Adland, E., Yates, K., Pauken, K. E., Cosgrove, C., Ledderose, C., Junger, W. G., Robson, S. C., Wherry, E. J., Alter, G., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sharpe, A. H., Lauer, G. M., & Haining, W. N. (2015). CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog*, 11(10), e1005177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005177>
- Gust, J., Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L. F., Yeung, C., Liles, W. C., Wurfel, M., Lopez, J. A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Ozpolat, T., Fink, K. R., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2017). Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov*, 7(12), 1404-1419. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0698>
- Gust, J., Ponce, R., Liles, W. C., Garden, G. A., & Turtle, C. J. (2020). Cytokines in CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Front Immunol*, 11, 577027. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.577027>
- Hale, M., Lee, B., Honaker, Y., Leung, W. H., Grier, A. E., Jacobs, H. M., Sommer, K., Sahni, J., Jackson, S. W., Scharenberg, A. M., Astrakhan, A., & Rawlings, D. J. (2017). Homology-Directed Recombination for Enhanced Engineering of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 4, 192-203. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.008>
- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R., & van Lier, R. A. (1997). Phenotypic and functional separation

- of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*, 186(9), 1407-1418. <https://doi.org/10.1084/jem.186.9.1407>
- Hamieh, M., Dobrin, A., Cabriolu, A., van der Stegen, S. J. C., Giavridis, T., Mansilla-Soto, J., Eyquem, J., Zhao, Z., Whitlock, B. M., Miele, M. M., Li, Z., Cunanan, K. M., Huse, M., Hendrickson, R. C., Wang, X., Riviere, I., & Sadelain, M. (2019). CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature*, 568(7750), 112-116. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1054-1>
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., Hanifin, J. M., & Slifka, M. K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med*, 9(9), 1131-1137. <https://doi.org/10.1038/nm917>
- Han, E. Q., Li, X. L., Wang, C. R., Li, T. F., & Han, S. Y. (2013). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges. *J Hematol Oncol*, 6, 47. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-47>
- Hand, T. W., Cui, W., Jung, Y. W., Sefik, E., Joshi, N. S., Chande, A., Liu, Y., & Kaech, S. M. (2010). Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(38), 16601-16606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003457107>
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., & Bloomfield, C. D. (1999). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol*, 10(12), 1419-1432. <https://doi.org/10.1023/a:1008375931236>
- Heipertz, E. L., Zynda, E. R., Stav-Noraas, T. E., Hungler, A. D., Boucher, S. E., Kaur, N., & Vemuri, M. C. (2021). Current Perspectives on "Off-The-Shelf" Allogeneic NK and CAR-NK Cell Therapies. *Front Immunol*, 12, 732135. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732135>
- Hill, J. A., Li, D., Hay, K. A., Green, M. L., Cherian, S., Chen, X., Riddell, S. R., Maloney, D. G., Boeckh, M., & Turtle, C. J. (2018). Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy. *Blood*, 131(1), 121-130. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-793760>
- Hinrichs, C. S., Spolski, R., Paulos, C. M., Gattinoni, L., Kerstann, K. W., Palmer, D. C., Klebanoff, C. A., Rosenberg, S. A., Leonard, W. J., & Restifo, N. P. (2008). IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*, 111(11), 5326-5333. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-113050>
- Ho, J. Y., Wang, L., Liu, Y., Ba, M., Yang, J., Zhang, X., Chen, D., Lu, P., & Li, J. (2021). Promoter usage regulating the surface density of CAR

- molecules may modulate the kinetics of CAR-T cells in vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 21, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.007>
- Hoffmann, J. M., Schubert, M. L., Wang, L., Huckelhoven, A., Sellner, L., Stock, S., Schmitt, A., Kleist, C., Gern, U., Loskog, A., Wuchter, P., Hofmann, S., Ho, A. D., Muller-Tidow, C., Dreger, P., & Schmitt, M. (2017). Differences in Expansion Potential of Naive Chimeric Antigen Receptor T Cells from Healthy Donors and Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Front Immunol*, 8, 1956. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01956>
- Hojjer, I., Emmanouilidou, A., Ostlund, R., van Schendel, R., Bozorgpana, S., Tijsterman, M., Feuk, L., Gyllensten, U., den Hoed, M., & Ameer, A. (2022). CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites in vivo that segregate across generations. *Nat Commun*, 13(1), 627. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28244-5>
- Hombach, A., Hombach, A. A., & Abken, H. (2010). Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther*, 17(10), 1206-1213. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.91>
- Hu, Y., Wang, J., Wei, G., Yu, J., Luo, Y., Shi, J., Wu, W., Zhao, K., Xiao, L., Zhang, Y., Wu, Z., Xu, H., Chang, A. H., & Huang, H. (2019). A retrospective comparison of allogenic and autologous chimeric antigen receptor T cell therapy targeting CD19 in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 54(8), 1208-1217. <https://doi.org/10.1038/s41409-018-0403-2>
- Hudecek, M., Lupo-Stanghellini, M. T., Kosasih, P. L., Sommermeyer, D., Jensen, M. C., Rader, C., & Riddell, S. R. (2013). Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res*, 19(12), 3153-3164. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0330>
- Jacobson, C., Chavez, J. C., Sehgal, A. R., William, B. M., Munoz, J., Salles, G., Munshi, P. N., Casulo, C., Maloney, D., & De Vos, S. (2020). Primary analysis of Zuma-5: a phase 2 study of axicabtagene ciloleucel (Axi-Cel) in patients with relapsed/refractory (R/R) indolent non-Hodgkin lymphoma (iNHL). *Blood*, 136, 40-41.
- Jacoby, E., Nguyen, S. M., Fountaine, T. J., Welp, K., Gryder, B., Qin, H., Yang, Y., Chien, C. D., Seif, A. E., Lei, H., Song, Y. K., Khan, J., Lee, D. W., Mackall, C. L., Gardner, R. A., Jensen, M. C., Shern, J. F., & Fry, T. J. (2016). CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic

- plasticity. *Nat Commun*, 7, 12320. <https://doi.org/10.1038/ncomms12320>
- Jan, M., Scarfo, I., Larson, R. C., Walker, A., Schmidts, A., Guirguis, A. A., Gasser, J. A., Slabicki, M., Bouffard, A. A., Castano, A. P., Kann, M. C., Cabral, M. L., Tepper, A., Grinshpun, D. E., Sperling, A. S., Kyung, T., Sievers, Q. L., Birnbaum, M. E., Maus, M. V., & Ebert, B. L. (2021). Reversible ON- and OFF-switch chimeric antigen receptors controlled by lenalidomide. *Sci Transl Med*, 13(575). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb6295>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jo, S., Das, S., Williams, A., Chretien, A. S., Pagliardini, T., Le Roy, A., Fernandez, J. P., Le Clerre, D., Jahangiri, B., Chion-Sotinel, I., Rozlan, S., Dessez, E., Gouble, A., Dusseaux, M., Galetto, R., Duclert, A., Marcenaro, E., Devillier, R., Olive, D., . . . Valton, J. (2022). Endowing universal CAR T-cell with immune-evasive properties using TALEN-gene editing. *Nat Commun*, 13(1), 3453. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30896-2>
- Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wunderlich, J. R., Lee, C. C., Restifo, N. P., Schwarz, S. L., Cogdill, A. P., Bishop, R. J., Kim, H., Brewer, C. C., Rudy, S. F., VanWaes, C., . . . Rosenberg, S. A. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114(3), 535-546. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211714>
- Kaartinen, T., Luostarinen, A., Maliniemi, P., Keto, J., Arvas, M., Belt, H., Koponen, J., Makinen, P. I., Loskog, A., Mustjoki, S., Porkka, K., Yla-Herttuala, S., & Korhonen, M. (2017). Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion. *Cytotherapy*, 19(6), 689-702. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.067>
- Kaech, S. M., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 2(4), 251-262. <https://doi.org/10.1038/nri778>
- Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C. H., Saso, K., Butler, M. O., Minden, M. D., & Hirano, N. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*, 24(3), 352-359. <https://doi.org/10.1038/nm.4478>
- Kasten, F. H. (1996). Paul Ehrlich: pathfinder in cell biology. 1. Chronicle of his life and accomplishments in immunology, cancer research, and

- chemotherapy. *Biotech Histochem*, 71(1), 2-37.
<https://doi.org/10.3109/10520299609117128>
- Kath, J., Du, W., Pruene, A., Braun, T., Thommandru, B., Turk, R., Sturgeon, M. L., Kurgan, G. L., Amini, L., Stein, M., Zittel, T., Martini, S., Ostendorf, L., Wilhelm, A., Akyuz, L., Rehm, A., Hopken, U. E., Pruss, A., Kunkele, A., . . . Wagner, D. L. (2022). Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 25, 311-330. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.03.018>
- Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E., & Dow, L. E. (2022). CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 22(5), 259-279. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00441-w>
- Kawalekar, O. U., O'Connor, R. S., Fraietta, J. A., Guo, L., McGettigan, S. E., Posey, A. D., Jr., Patel, P. R., Guedan, S., Scholler, J., Keith, B., Snyder, N. W., Blair, I. A., Milone, M. C., & June, C. H. (2016). Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*, 44(2), 380-390. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>
- Kebriaei, P., Singh, H., Huls, M. H., Figliola, M. J., Bassett, R., Olivares, S., Jena, B., Dawson, M. J., Kumaresan, P. R., Su, S., Maiti, S., Dai, J., Moriarity, B., Forget, M. A., Senyukov, V., Orozco, A., Liu, T., McCarty, J., Jackson, R. N., . . . Cooper, L. J. (2016). Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest*, 126(9), 3363-3376. <https://doi.org/10.1172/JCI86721>
- Kent, W. J. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*, 12(4), 656-664. <https://doi.org/10.1101/gr.229202>
- Kim, E. H., Sullivan, J. A., Plisch, E. H., Tejera, M. M., Jatzek, A., Choi, K. Y., & Suresh, M. (2012). Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J Immunol*, 188(9), 4305-4314. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103568>
- Kim, H., & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 15(5), 321-334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Kim, S., Koo, T., Jee, H. G., Cho, H. Y., Lee, G., Lim, D. G., Shin, H. S., & Kim, J. S. (2018). CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res*. <https://doi.org/10.1101/gr.231936.117>
- Klebanoff, C. A., Crompton, J. G., Leonardi, A. J., Yamamoto, T. N., Chandran, S. S., Eil, R. L., Sukumar, M., Vodnala, S. K., Hu, J., Ji, Y., Clever, D., Black, M. A., Gurusamy, D., Kruhlak, M. J., Jin, P., Stroncek, D. F., Gattinoni, L., Feldman, S. A., & Restifo, N. P. (2017). Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI Insight*, 2(23). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95103>

- Kochenderfer, J. N., Feldman, S. A., Zhao, Y., Xu, H., Black, M. A., Morgan, R. A., Wilson, W. H., & Rosenberg, S. A. (2009). Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*, 32(7), 689-702. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181ac6138>
- Korman, A. J., Garrett-Thomson, S. C., & Lonberg, N. (2022). The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial. *Nat Rev Drug Discov*, 21(7), 509-528. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00345-8>
- Kosicki, M., Allen, F., Steward, F., Tomberg, K., Pan, Y., & Bradley, A. (2022). Cas9-induced large deletions and small indels are controlled in a convergent fashion. *Nat Commun*, 13(1), 3422. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30480-8>
- Kosicki, M., Tomberg, K., & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 36(8), 765-771. <https://doi.org/10.1038/nbt.4192>
- Krawczyk, M., Peyraud, N., Rybtsova, N., Masternak, K., Bucher, P., Barras, E., & Reith, W. (2004). Long distance control of MHC class II expression by multiple distal enhancers regulated by regulatory factor X complex and CIITA. *J Immunol*, 173(10), 6200-6210. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6200>
- Labanieh, L., Majzner, R. G., Klysz, D., Sotillo, E., Fisher, C. J., Vilches-Moure, J. G., Pacheco, K. Z. B., Malipatlolla, M., Xu, P., Hui, J. H., Murty, T., Theruvath, J., Mehta, N., Yamada-Hunter, S. A., Weber, E. W., Heitzeneder, S., Parker, K. R., Satpathy, A. T., Chang, H. Y., . . . Mackall, C. L. (2022). Enhanced safety and efficacy of protease-regulated CAR-T cell receptors. *Cell*, 185(10), 1745-1763 e1722. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.041>
- Labbe, R. P., Vessillier, S., & Rafiq, Q. A. (2021). Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives. *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/v13081528>
- Labrecque, N., Whitfield, L. S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., & Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity*, 15(1), 71-82. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00170-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00170-4)
- Le Bourgeois, T., Strauss, L., Aksoylar, H. I., Daneshmandi, S., Seth, P., Patsoukis, N., & Boussiotis, V. A. (2018). Targeting T Cell Metabolism for Improvement of Cancer Immunotherapy. *Front Oncol*, 8, 237. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00237>
- Leone, R. D., Zhao, L., Englert, J. M., Sun, I. M., Oh, M. H., Sun, I. H., Arwood, M. L., Bettencourt, I. A., Patel, C. H., Wen, J., Tam, A., Blosser, R. L., Prchalova, E., Alt, J., Rais, R., Slusher, B. S., & Powell, J. D. (2019). Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to

- overcome tumor immune evasion. *Science*, 366(6468), 1013-1021. <https://doi.org/10.1126/science.aav2588>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, W., Zhu, X., Xu, Y., Chen, J., Zhang, H., Yang, Z., Qi, Y., Hong, J., Li, Y., Wang, G., Shen, J., & Qian, C. (2022). Simultaneous editing of TCR, HLA-I/II and HLA-E resulted in enhanced universal CAR-T resistance to allo-rejection. *Front Immunol*, 13, 1052717. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1052717>
- Li, Z., Meng, F., Li, J., & Wu, T. (2022). Donor-Derived CD7 CAR-T Therapy Followed by Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute T-Lymphocytic Leukemia Associated With Hepatitis B: A Case Report. *Front Immunol*, 13, 931452. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931452>
- Lin, J., Sun, S., Zhao, K., Gao, F., Wang, R., Li, Q., Zhou, Y., Zhang, J., Li, Y., Wang, X., Du, L., Wang, S., Li, Z., Lu, H., Lan, Y., Song, D., Guo, W., Chen, Y., Gao, F., . . . He, W. (2023). Oncolytic Parapoxvirus induces Gasdermin E-mediated pyroptosis and activates antitumor immunity. *Nat Commun*, 14(1), 224. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35917-2>
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., & Vignali, D. A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*, 13(5), 665-675. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00066-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00066-2)
- Liu, M., Zhang, W., Xin, C., Yin, J., Shang, Y., Ai, C., Li, J., Meng, F. L., & Hu, J. (2021). Global detection of DNA repair outcomes induced by CRISPR-Cas9. *Nucleic Acids Res*, 49(15), 8732-8742. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab686>
- Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E. C., Cogdill, A. P., Li, N., Ramones, M., Granda, B., Zhou, L., Loew, A., Young, R. M., June, C. H., & Zhao, Y. (2015). Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res*, 75(17), 3596-3607. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0159>
- Ma, E. H., Poffenberger, M. C., Wong, A. H., & Jones, R. G. (2017). The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Curr Opin Immunol*, 46, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.04.004>
- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A. R., Kim, D., Kim, S. T., Gong, J., Gu, Y., . . . Mitalipov, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668), 413-419. <https://doi.org/10.1038/nature23305>

- MacLeod, D. T., Antony, J., Martin, A. J., Moser, R. J., Hekele, A., Wetzel, K. J., Brown, A. E., Triggiano, M. A., Hux, J. A., Pham, C. D., Bartsevich, V. V., Turner, C. A., Lape, J., Kirkland, S., Beard, C. W., Smith, J., Hirsch, M. L., Nicholson, M. G., Jantz, D., & McCreedy, B. (2017). Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol Ther*, *25*(4), 949-961. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.005>
- Mahadeo, K. M., Khazal, S. J., Abdel-Azim, H., Fitzgerald, J. C., Taraseviciute, A., Bollard, C. M., Tewari, P., Duncan, C., Traube, C., McCall, D., Steiner, M. E., Cheifetz, I. M., Lehmann, L. E., Mejia, R., Slopis, J. M., Bajwa, R., Kebriaei, P., Martin, P. L., Moffet, J., . . . Sepsis Investigators, N. (2019). Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, *16*(1), 45-63. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0075-2>
- Majzner, R. G., Rietberg, S. P., Sotillo, E., Dong, R., Vachharajani, V. T., Labanieh, L., Myklebust, J. H., Kadapakkam, M., Weber, E. W., Tousley, A. M., Richards, R. M., Heitzeneder, S., Nguyen, S. M., Wiebking, V., Theruvath, J., Lynn, R. C., Xu, P., Dunn, A. R., Vale, R. D., & Mackall, C. L. (2020). Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov*, *10*(5), 702-723. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0945>
- Makita, S., Yoshimura, K., & Tobinai, K. (2017). Clinical development of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci*, *108*(6), 1109-1118. <https://doi.org/10.1111/cas.13239>
- Maldonado-Perez, N., Tristan-Manzano, M., Justicia-Lirio, P., Martinez-Planes, E., Munoz, P., Pavlovic, K., Cortijo-Gutierrez, M., Blanco-Benitez, C., Castella, M., Juan, M., Wenes, M., Romero, P., Molina-Estevez, F. J., Maranon, C., Herrera, C., Benabdellah, K., & Martin, F. (2022). Efficacy and safety of universal (TCRKO) ARI-0001 CAR-T cells for the treatment of B-cell lymphoma. *Front Immunol*, *13*, 1011858. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011858>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261-1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Mao, R., Kong, W., & He, Y. (2022). The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better. *Front Immunol*, *13*, 1032403. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1032403>
- Marofi, F., Motavalli, R., Safonov, V. A., Thangavelu, L., Yumashev, A. V., Alexander, M., Shomali, N., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Jarahian, M., Izadi, S., Hassanzadeh, A., Shirafkan, N., Tahmasebi, S., & Khiavi, F. M.

- (2021). CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02128-1>
- Martin, F., Sanchez-Hernandez, S., Gutierrez-Guerrero, A., Pinedo-Gomez, J., & Benabdellah, K. (2016). Biased and Unbiased Methods for the Detection of Off-Target Cleavage by CRISPR/Cas9: An Overview. *Int J Mol Sci*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091507>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., . . . Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378(5), 439-448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>
- Maus, M. V., Grupp, S. A., Porter, D. L., & June, C. H. (2014). Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, 123(17), 2625-2635. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-492231>
- Mendoza, A., Fang, V., Chen, C., Serasinghe, M., Verma, A., Muller, J., Chaluvadi, V. S., Dustin, M. L., Hla, T., Elemento, O., Chipuk, J. E., & Schwab, S. R. (2017). Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature*, 546(7656), 158-161. <https://doi.org/10.1038/nature22352>
- Mianne, J., Codner, G. F., Caulder, A., Fell, R., Hutchison, M., King, R., Stewart, M. E., Wells, S., & Teboul, L. (2017). Analysing the outcome of CRISPR-aided genome editing in embryos: Screening, genotyping and quality control. *Methods*, 121-122, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.016>
- Michaux, A., Mauen, S., Breman, E., Dheur, M. S., Twyffels, L., Saerens, L., Jacques-Hespel, C., Gauthy, E., Agaogue, S., Gilham, D. E., & Sotiropoulou, P. A. (2022). Clinical Grade Manufacture of CYAD-101, a NKG2D-based, First in Class, Non-Gene-edited Allogeneic CAR T-Cell Therapy. *J Immunother*, 45(3), 150-161. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000413>
- Milone, M. C., Fish, J. D., Carpenito, C., Carroll, R. G., Binder, G. K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhai, M., Gloss, B., & Danet-Desnoyers, G. (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular therapy*, 17(8), 1453-1464.
- Minami, Y., Samelson, L. E., & Klausner, R. D. (1987). Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*, 262(27), 13342-13347. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3498715>

- Minkenberg, B., Wheatley, M., & Yang, Y. (2017). CRISPR/Cas9-Enabled Multiplex Genome Editing and Its Application. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 149, 111-132. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.05.003>
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., von Kalle, C., & Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*, 24(6), 687-696. <https://doi.org/10.1038/nbt1216>
- Moroz, A., Eppolito, C., Li, Q., Tao, J., Clegg, C. H., & Shrikant, P. A. (2004). IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol*, 173(2), 900-909. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.900>
- Mueller, K. P., Piscopo, N. J., Forsberg, M. H., Saraspe, L. A., Das, A., Russell, B., Smerchansky, M., Cappabianca, D., Shi, L., Shankar, K., Sarko, L., Khajanchi, N., La Vonne Denne, N., Ramamurthy, A., Ali, A., Lazzarotto, C. R., Tsai, S. Q., Capitini, C. M., & Saha, K. (2022). Production and characterization of virus-free, CRISPR-CAR T cells capable of inducing solid tumor regression. *J Immunother Cancer*, 10(9). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004446>
- Munshi, N. C., Anderson, L. D., Jr., Shah, N., Madduri, D., Berdeja, J., Lonial, S., Raje, N., Lin, Y., Siegel, D., Oriol, A., Moreau, P., Yakoub-Agha, I., Delforge, M., Cavo, M., Einsele, H., Goldschmidt, H., Weisel, K., Rambaldi, A., Reece, D., . . . San-Miguel, J. (2021). Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 384(8), 705-716. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024850>
- Murphy, K., Weaver, C. (2017). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science.
- Nahmad, A. D., Reuveni, E., Goldschmidt, E., Tenne, T., Liberman, M., Horovitz-Fried, M., Khosravi, R., Kobo, H., Reinstein, E., Madi, A., Ben-David, U., & Barzel, A. (2022). Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR-Cas9 cleavage. *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01377-0>
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>
- Nastoupil, L. J., Jain, M. D., Feng, L., Spiegel, J. Y., Ghobadi, A., Lin, Y., Dahiya, S., Lunning, M., Lekakis, L., Reagan, P., Oluwole, O., McGuirk, J., Deol, A., Sehgal, A. R., Goy, A., Hill, B. T., Vu, K., Andreadis, C., Munoz, J., . . . Locke, F. L. (2020). Standard-of-Care Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma: Results From the US

- Lymphoma CAR T Consortium. *J Clin Oncol*, 38(27), 3119-3128.
<https://doi.org/10.1200/JCO.19.02104>
- Oak, J. S., & Fruman, D. A. (2007). Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in autoimmunity. *Autoimmunity*, 40(6), 433-441.
<https://doi.org/10.1080/08916930701464780>
- Oh, S. A., & Li, M. O. (2013). TGF-beta: guardian of T cell function. *J Immunol*, 191(8), 3973-3979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301843>
- Okkenhaug, K., & Vanhaesebroeck, B. (2003). PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 317-330. <https://doi.org/10.1038/nri1056>
- Olson, J. A., Leveson-Gower, D. B., Gill, S., Baker, J., Beilhack, A., & Negrin, R. S. (2010). NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*, 115(21), 4293-4301. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222190>
- Orlando, E. J., Han, X., Tribouley, C., Wood, P. A., Leary, R. J., Riester, M., Levine, J. E., Qayed, M., Grupp, S. A., Boyer, M., De Moerloose, B., Nemecek, E. R., Bittencourt, H., Hiramatsu, H., Buechner, J., Davies, S. M., Verneris, M. R., Nguyen, K., Brogdon, J. L., . . . Winckler, W. (2018). Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, 24(10), 1504-1506.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0146-z>
- Ortiz-Maldonado, V., Frigola, G., Espanol-Rego, M., Balague, O., Martinez-Cibrian, N., Magnano, L., Gine, E., Pascal, M., Correa, J. G., Martinez-Roca, A., Cid, J., Lozano, M., Villamor, N., Benitez-Ribas, D., Esteve, J., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Urbano-Ispizua, A., Juan, M., & Delgado, J. (2022). Results of ARI-0001 CART19 Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia and Richter's Transformation. *Front Oncol*, 12, 828471. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.828471>
- Ortiz-Maldonado, V., Rives, S., Castella, M., Alonso-Saladrigues, A., Benitez-Ribas, D., Caballero-Banos, M., Baumann, T., Cid, J., Garcia-Rey, E., Llanos, C., Torrebadell, M., Villamor, N., Gine, E., Diaz-Beya, M., Guardia, L., Montoro, M., Catala, A., Faura, A., Gonzalez, E. A., . . . Delgado, J. (2021). CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19(+) Relapsed/Refractory Malignancies. *Mol Ther*, 29(2), 636-644.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.027>
- Ottaviano, G., Georgiadis, C., Gkazi, S. A., Syed, F., Zhan, H., Etuk, A., Preece, R., Chu, J., Kubat, A., Adams, S., Veys, P., Vora, A., Rao, K., Qasim, W., & group, T. C.-C. (2022). Phase 1 clinical trial of CRISPR-engineered CAR19 universal T cells for treatment of children with refractory B cell leukemia. *Sci Transl Med*, 14(668), eabq3010.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq3010>

- Ouyang, W., Liao, W., Luo, C. T., Yin, N., Huse, M., Kim, M. V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., Meijer, D., Zhao, K., Rudensky, A. Y., Atwal, G., Zhang, M. Q., & Li, M. O. (2012). Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature*, 491(7425), 554-559. <https://doi.org/10.1038/nature11581>
- Owens, D. D. G., Caulder, A., Frontera, V., Harman, J. R., Allan, A. J., Bucakci, A., Greder, L., Codner, G. F., Hublitz, P., McHugh, P. J., Teboul, L., & de Bruijn, M. (2019). Microhomologies are prevalent at Cas9-induced larger deletions. *Nucleic Acids Res*, 47(14), 7402-7417. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz459>
- Pan, J., Zuo, S., Deng, B., Xu, X., Li, C., Zheng, Q., Ling, Z., Song, W., Xu, J., Duan, J., Wang, Z., Yu, X., Chang, A. H., Feng, X., & Tong, C. (2020). Sequential CD19-22 CAR T therapy induces sustained remission in children with r/r B-ALL. *Blood*, 135(5), 387-391. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003293>
- Park, J., Lim, K., Kim, J. S., & Bae, S. (2017). Cas-analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics*, 33(2), 286-288. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw561>
- Park, J. H., Riviere, I., Gonen, M., Wang, X., Senechal, B., Curran, K. J., Sauter, C., Wang, Y., Santomasso, B., Mead, E., Roshal, M., Maslak, P., Davila, M., Brentjens, R. J., & Sadelain, M. (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378(5), 449-459. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709919>
- Pasquini, M. C., Hu, Z. H., Curran, K., Laetsch, T., Locke, F., Rouse, R., Pulsipher, M. A., Phillips, C. L., Keating, A., Frigault, M. J., Salzberg, D., Jaglowski, S., Sasine, J. P., Rosenthal, J., Ghosh, M., Landsburg, D., Margossian, S., Martin, P. L., Kamdar, M. K., . . . Grupp, S. (2020). Real-world evidence of tisagenlecleucel for pediatric acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv*, 4(21), 5414-5424. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003092>
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633-643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- Pearce, E. L., Walsh, M. C., Cejas, P. J., Harms, G. M., Shen, H., Wang, L. S., Jones, R. G., & Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*, 460(7251), 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature08097>
- Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., & Schneck, J. (2015). Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Med J*, 6(1), e0004. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10179>
- Picker, L. J., & Butcher, E. C. (1992). Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol*, 10, 561-591. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.003021>

- Pietrobon, V., Todd, L. A., Goswami, A., Stefanson, O., Yang, Z., & Marincola, F. (2021). Improving CAR T-Cell Persistence. *Int J Mol Sci*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910828>
- Poirot, L., Philip, B., Schiffer-Mannioui, C., Le Clerre, D., Chion-Sotinel, I., Derniame, S., Potrel, P., Bas, C., Lemaire, L., Galetto, R., Lebuhotel, C., Eyquem, J., Cheung, G. W., Duclert, A., Gouble, A., Arnould, S., Peggs, K., Pule, M., Scharenberg, A. M., & Smith, J. (2015). Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res*, 75(18), 3853-3864. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3321>
- Prockop, S., Mahadeo, K. M., Beitinjaneh, A., Choquet, S., Stiff, P., Reshef, R., Satyanarayana, G., Dahiya, S., Parmar, H., Ye, W., Gamelin, L., & Dinavahi, R. (2021). Multicenter, Open-Label, Phase 3 Study of Tabelecleucel for Solid Organ or Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients with Epstein-Barr Virus-Driven Post Transplant Lymphoproliferative Disease after Failure of Rituximab or Rituximab and Chemotherapy (ALLELE). *Blood*, 138, 301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2021-147274>
- Prommersberger, S., Reiser, M., Beckmann, J., Danhof, S., Amberger, M., Quade-Lyssa, P., Einsele, H., Hudecek, M., Bonig, H., & Ivics, Z. (2021). 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 Ther*, 28(9), 560-571. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00254-w>
- Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amrolia, P., Stafford, S., Butler, K., Rivat, C., Wright, G., Somana, K., Ghorashian, S., Pinner, D., Ahsan, G., Gilmour, K., Lucchini, G., Inglott, S., Mifsud, W., Chiesa, R., Peggs, K. S., . . . Veys, P. (2017). Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*, 9(374). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2013>
- Ramanayake, S., Bilton, I., Bishop, D., Dubosq, M. C., Blyth, E., Clancy, L., Gottlieb, D., & Micklethwaite, K. (2015). Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy*, 17(9), 1251-1267. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.05.013>
- Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(25), 10190-10195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108>

- Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W., & Thompson, C. B. (2001). IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol*, *167*(12), 6869-6876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6869>
- Ren, J., Liu, X., Fang, C., Jiang, S., June, C. H., & Zhao, Y. (2017). Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res*, *23*(9), 2255-2266. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1300>
- Ren, J., Zhang, X., Liu, X., Fang, C., Jiang, S., June, C. H., & Zhao, Y. (2017). A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*, *8*(10), 17002-17011. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15218>
- Ribatti, D. (2017). The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, *8*(4), 7175-7180. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12739>
- Richer, M. J., Pewe, L. L., Hancox, L. S., Hartwig, S. M., Varga, S. M., & Harty, J. T. (2015). Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses. *J Clin Invest*, *125*(9), 3477-3490. <https://doi.org/10.1172/JCI81261>
- Robbins, P. F., Kassim, S. H., Tran, T. L., Crystal, J. S., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Restifo, N. P., Raffeld, M., Lee, C. C., Li, Y. F., El-Gamil, M., & Rosenberg, S. A. (2015). A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res*, *21*(5), 1019-1027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2708>
- Roberto, A., Castagna, L., Zanon, V., Bramanti, S., Crocchiolo, R., McLaren, J. E., Gandolfi, S., Tentorio, P., Sarina, B., Timofeeva, I., Santoro, A., Carlo-Stella, C., Bruno, B., Carniti, C., Corradini, P., Gostick, E., Ladell, K., Price, D. A., Roederer, M., . . . Lugli, E. (2015). Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. *Blood*, *125*(18), 2855-2864. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-608406>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, *29*(1), 24-26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rodriguez-Marquez, P., Calleja-Cervantes, M. E., Serrano, G., Oliver-Caldes, A., Palacios-Berraquero, M. L., Martin-Mallo, A., Calvino, C., Espanol-Rego, M., Ceballos, C., Lozano, T., San Martin-Uriz, P., Vilas-Zornoza, A., Rodriguez-Diaz, S., Martinez-Turrillas, R., Jauregui, P., Alignani, D., Viguria, M. C., Redondo, M., Pascal, M., . . . Prosper, F. (2022). CAR density influences antitumoral efficacy of BCMA CAR T cells and

- correlates with clinical outcome. *Sci Adv*, 8(39), eabo0514. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo0514>
- Roselli, E., Boucher, J. C., Li, G., Kotani, H., Spitler, K., Reid, K., Cervantes, E. V., Bulliard, Y., Tu, N., Lee, S. B., Yu, B., Locke, F. L., & Davila, M. L. (2021). 4-1BB and optimized CD28 co-stimulation enhances function of human mono-specific and bi-specific third-generation CAR T cells. *J Immunother Cancer*, 9(10). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003354>
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., & et al. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 323(9), 570-578. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>
- Rostamian, H., Fallah-Mehrjardi, K., Khakpoor-Koosheh, M., Pawelek, J. M., Hadjati, J., Brown, C. E., & Mirzaei, H. R. (2021). A metabolic switch to memory CAR T cells: Implications for cancer treatment. *Cancer Lett*, 500, 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.004>
- Ruella, M., Xu, J., Barrett, D. M., Fraietta, J. A., Reich, T. J., Ambrose, D. E., Klichinsky, M., Shestova, O., Patel, P. R., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Bhoj, V. G., Orlando, E. J., Fry, T. J., Bitter, H., Maude, S. L., Levine, B. L., Nobles, C. L., Bushman, F. D., . . . Melenhorst, J. J. (2018). Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med*, 24(10), 1499-1503. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0201-9>
- Sabatino, M., Hu, J., Sommariva, M., Gautam, S., Fellowes, V., Hocker, J. D., Dougherty, S., Qin, H., Klebanoff, C. A., Fry, T. J., Gress, R. E., Kochenderfer, J. N., Stroncek, D. F., Ji, Y., & Gattinoni, L. (2016). Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8+ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood*, 128(4), 519-528. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-683847>
- Sachdeva, M., Busser, B. W., Temburni, S., Jahangiri, B., Gautron, A. S., Marechal, A., Juillerat, A., Williams, A., Depil, S., Duchateau, P., Poirot, L., & Valton, J. (2019). Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality. *Nat Commun*, 10(1), 5100. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13088-3>
- Salim, T., Sershen, C. L., & May, E. E. (2016). Investigating the Role of TNF-alpha and IFN-gamma Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS One*, 11(6), e0153289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153289>
- Salles, G., Schuster, S. J., Dreyling, M., Fischer, L., Kuruvilla, J., Patten, P. E. M., von Tresckow, B., Smith, S. M., Jimenez-Ubieto, A., Davis, K. L., Anjos, C., Chu, J., Zhang, J., Lobetti Bodoni, C., Thieblemont, C., Fowler, N. H.,

- Dickinson, M., Martinez-Lopez, J., Wang, Y., & Link, B. K. (2022). Efficacy comparison of tisagenlecleucel vs usual care in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Blood Adv*, *6*(22), 5835-5843. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008150>
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, *401*(6754), 708-712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Salmond, R. J. (2018). mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. *Front Cell Dev Biol*, *6*, 122. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00122>
- San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., & Alarcon, B. (2000). Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity*, *12*(2), 161-170. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80169-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80169-7)
- Sasu, B. J., Opiteck, G. J., Gopalakrishnan, S., Kaimal, V., Furmanak, T., Huang, D., Goswami, A., He, Y., Chen, J., Nguyen, A., Balakumaran, A., Shah, N. N., Hamadani, M., Bone, K. M., Prashad, S., Bowen, M. A., Pertel, T., Embree, H. D., Gidwani, S. G., . . . Amado, R. G. (2022). Detection of Chromosomal Alteration After Infusion of Gene Edited Allogeneic CAR T Cells. *Mol Ther*. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.12.004>
- Saura-Esteller, J., de Jong, M., King, L. A., Ensing, E., Winograd, B., de Gruijl, T. D., Parren, P., & van der Vliet, H. J. (2022). Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front Immunol*, *13*, 915837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.915837>
- Savoldo, B., Ramos, C. A., Liu, E., Mims, M. P., Keating, M. J., Carrum, G., Kamble, R. T., Bollard, C. M., Gee, A. P., Mei, Z., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, *121*(5), 1822-1826. <https://doi.org/10.1172/JCI46110>
- Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., Ferris, R. L., & Delgoffe, G. M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*, *45*(2), 374-388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>
- Scholz, G., Jandus, C., Zhang, L., Grandclement, C., Lopez-Mejia, I. C., Sonesson, C., Delorenzi, M., Fajas, L., Held, W., Dormond, O., & Romero, P. (2016). Modulation of mTOR Signalling Triggers the Formation of Stem Cell-like Memory T Cells. *EBioMedicine*, *4*, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.019>

- Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hammerling, G. J., & Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell*, 65(2), 293-304. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90163-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90163-s)
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, 21, 305-334. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110>
- Seki, A., & Rutz, S. (2018). Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *J Exp Med*, 215(3), 985-997. <https://doi.org/10.1084/jem.20171626>
- Shah, N. N., Maatman, T., Hari, P., & Johnson, B. (2019). Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Front Oncol*, 9, 146. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00146>
- Shah, N. N., Qin, H., Yates, B., Su, L., Shalabi, H., Raffeld, M., Ahlman, M. A., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Guo, S., Liu, S., Hughes, S. H., Fry, T. J., & Wu, X. (2019). Clonal expansion of CAR T cells harboring lentivector integration in the CBL gene following anti-CD22 CAR T-cell therapy. *Blood Adv*, 3(15), 2317-2322. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000219>
- Sheridan, C. (2022). Off-the-shelf, gene-edited CAR-T cells forge ahead, despite safety scare. *Nat Biotechnol*, 40(1), 5-8. <https://doi.org/10.1038/d41587-021-00027-1>
- Shin, H. Y., Wang, C., Lee, H. K., Yoo, K. H., Zeng, X., Kuhns, T., Yang, C. M., Mohr, T., Liu, C., & Hennighausen, L. (2017). CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nat Commun*, 8, 15464. <https://doi.org/10.1038/ncomms15464>
- Sievers, S., Watson, G., Johncy, S., & Adkins, S. (2020). Recognizing and Grading CAR T-Cell Toxicities: An Advanced Practitioner Perspective. *Front Oncol*, 10, 885. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00885>
- Singer, M., Wang, C., Cong, L., Marjanovic, N. D., Kowalczyk, M. S., Zhang, H., Nyman, J., Sakuishi, K., Kurtulus, S., Gennert, D., Xia, J., Kwon, J. Y. H., Nevin, J., Herbst, R. H., Yanai, I., Rozenblatt-Rosen, O., Kuchroo, V. K., Regev, A., & Anderson, A. C. (2016). A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. *Cell*, 166(6), 1500-1511 e1509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.052>
- Singh, H., Manuri, P. R., Olivares, S., Dara, N., Dawson, M. J., Huls, H., Hackett, P. B., Kohn, D. B., Shpall, E. J., Champlin, R. E., & Cooper, L. J. (2008). Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res*, 68(8), 2961-2971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5600>

- Singh, N., Perazzelli, J., Grupp, S. A., & Barrett, D. M. (2016). Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies. *Sci Transl Med*, 8(320), 320ra323. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad5222>
- Sommer, C., Boldajipour, B., Kuo, T. C., Bentley, T., Sutton, J., Chen, A., Geng, T., Dong, H., Galetto, R., Valton, J., Pertel, T., Juillerat, A., Gariboldi, A., Pascua, E., Brown, C., Chin, S. M., Sai, T., Ni, Y., Duchateau, P., . . . Sasu, B. J. (2019). Preclinical Evaluation of Allogeneic CAR T Cells Targeting BCMA for the Treatment of Multiple Myeloma. *Mol Ther*, 27(6), 1126-1138. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.04.001>
- Song, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Chen, M., Sui, T., Lai, L., & Li, Z. (2020). Large-Fragment Deletions Induced by Cas9 Cleavage while Not in the BEs System. *Mol Ther Nucleic Acids*, 21, 523-526. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.06.019>
- Stadtmauer, E. A., Fraietta, J. A., Davis, M. M., Cohen, A. D., Weber, K. L., Lancaster, E., Mangan, P. A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V. E., Xu, J., Jung, I. Y., Melenhorst, J. J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., . . . June, C. H. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 367(6481). <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
- Stenger, D., Stief, T. A., Kaeuferle, T., Willier, S., Rataj, F., Schober, K., Vick, B., Lotfi, R., Wagner, B., Grunewald, T. G. P., Kobold, S., Busch, D. H., Jeremias, I., Blaeschke, F., & Feuchtinger, T. (2020). Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood*, 136(12), 1407-1418. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005185>
- Sukumar, M., Kishton, R. J., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 46, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.011>
- Svoboda, J., Rheingold, S. R., Gill, S. I., Grupp, S. A., Lacey, S. F., Kulikovskaya, I., Suhoski, M. M., Melenhorst, J. J., Loudon, B., Mato, A. R., Nasta, S. D., Landsburg, D. J., Youngman, M. R., Levine, B. L., Porter, D. L., June, C. H., & Schuster, S. J. (2018). Nonviral RNA chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood*, 132(10), 1022-1026. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-837609>
- Tammana, S., Huang, X., Wong, M., Milone, M. C., Ma, L., Levine, B. L., June, C. H., Wagner, J. E., Blazar, B. R., & Zhou, X. (2010). 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum Gene Ther*, 21(1), 75-86. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.122>
- Tarailo-Graovac, M., & Chen, N. (2009). Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 4, Unit 4 10. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0410s25>

- Tejera, M. M., Kim, E. H., Sullivan, J. A., Plisch, E. H., & Suresh, M. (2013). FoxO1 controls effector-to-memory transition and maintenance of functional CD8 T cell memory. *J Immunol*, *191*(1), 187-199. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300331>
- Thomas, S., Mohammed, F., Reijmers, R. M., Woolston, A., Stauss, T., Kennedy, A., Stirling, D., Holler, A., Green, L., Jones, D., Matthews, K. K., Price, D. A., Chain, B. M., Heemskerk, M. H. M., Morris, E. C., Willcox, B. E., & Stauss, H. J. (2019). Framework engineering to produce dominant T cell receptors with enhanced antigen-specific function. *Nat Commun*, *10*(1), 4451. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12441-w>
- Tian, Y., & Zajac, A. J. (2016). IL-21 and T Cell Differentiation: Consider the Context. *Trends Immunol*, *37*(8), 557-568. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.001>
- Tipanee, J., Samara-Kuko, E., Gevaert, T., Chuah, M. K., & VandenDriessche, T. (2022). Universal allogeneic CAR T cells engineered with Sleeping Beauty transposons and CRISPR-CAS9 for cancer immunotherapy. *Mol Ther*, *30*(10), 3155-3175. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.06.006>
- Torikai, H., & Cooper, L. J. (2016). Translational Implications for Off-the-shelf Immune Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther*, *24*(7), 1178-1186. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.106>
- Torikai, H., Reik, A., Liu, P. Q., Zhou, Y., Zhang, L., Maiti, S., Huls, H., Miller, J. C., Kebriaei, P., Rabinovich, B., Lee, D. A., Champlin, R. E., Bonini, C., Naldini, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Holmes, M. C., & Cooper, L. J. (2012). A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*, *119*(24), 5697-5705. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405365>
- Trias, E., Juan, M., Urbano-Ispizua, A., & Calvo, G. (2022). The hospital exemption pathway for the approval of advanced therapy medicinal products: an underused opportunity? The case of the CAR-T ARI-0001. *Bone Marrow Transplantation*, *57*(2), 156-159. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01463-y>
- Tristán-Manzano, M., Maldonado-Pérez, N., Justicia-Lirio, P., Muñoz, P., Cortijo-Gutiérrez, M., Pavlovic, K., Jiménez-Moreno, R., Nogueras, S., Carmona, M. D., Sánchez-Hernández, S., Aguilar-González, A., Castella, M., Juan, M., Marañón, C., Marchal, J. A., Benabdellah, K., Herrera, C., & Martin, F. (2022). Physiological lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells. *Mol Ther Oncolytics*, *25*, 335-349. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.05.003>
- Tristan-Manzano, M., Maldonado-Perez, N., Justicia-Lirio, P., & Pilar Muñoz 1 3, M. C.-G., Kristina Pavlovic 1 3, Rosario Jiménez-Moreno 4, Sonia Nogueras 4, M Dolores Carmona 4, Sabina Sánchez-Hernández 1,

- Araceli Aguilar-González 1 5, María Castella 6, Manel Juan 6, Concepción Marañón 1, Juan Antonio Marchal 7, Karim Benabdellah 1, Concha Herrera 4, Francisco Martin 1 8. (2022). Physiological lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells. *Mol Ther Oncolytics*, 25, 335-349. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.05.003>
- Urak, R., Walter, M., Lim, L., Wong, C. W., Budde, L. E., Thomas, S., Forman, S. J., & Wang, X. (2017). Ex vivo Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 5, 26. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0227-4>
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., & Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*, 375(6527), 148-151. <https://doi.org/10.1038/375148a0>
- Valton, J., Guyot, V., Marechal, A., Filhol, J. M., Juillerat, A., Duclert, A., Duchateau, P., & Poirot, L. (2015). A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy. *Mol Ther*, 23(9), 1507-1518. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.104>
- van der Windt, G. J., Everts, B., Chang, C. H., Curtis, J. D., Freitas, T. C., Amiel, E., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2012). Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*, 36(1), 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.007>
- van der Windt, G. J., O'Sullivan, D., Everts, B., Huang, S. C., Buck, M. D., Curtis, J. D., Chang, C. H., Smith, A. M., Ai, T., Faubert, B., Jones, R. G., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2013). CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(35), 14336-14341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221740110>
- Vitale, C., & Strati, P. (2020). CAR T-Cell Therapy for B-Cell non-Hodgkin Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Trials and Real-World Experiences. *Front Oncol*, 10, 849. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00849>
- von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 3(11), 867-878. <https://doi.org/10.1038/nri1222>
- Wang, B., Iriguchi, S., Waseda, M., Ueda, N., Ueda, T., Xu, H., Minagawa, A., Ishikawa, A., Yano, H., Ishi, T., Ito, R., Goto, M., Takahashi, R., Uemura, Y., Hotta, A., & Kaneko, S. (2021). Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng*, 5(5), 429-440. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00730-z>
- Wang, Y., Wang, X. Y., Subjeck, J. R., Shrikant, P. A., & Kim, H. L. (2011). Temsirolimus, an mTOR inhibitor, enhances anti-tumour effects of

- heat shock protein cancer vaccines. *Br J Cancer*, 104(4), 643-652.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.15>
- Waring, P., & Mullbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol*, 77(4), 312-317.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x>
- Webber, B. R., Lonetree, C. L., Kluesner, M. G., Johnson, M. J., Pomeroy, E. J., Diers, M. D., Lahr, W. S., Draper, G. M., Slipek, N. J., Smeester, B. A., Lovendahl, K. N., McElroy, A. N., Gordon, W. R., Osborn, M. J., & Moriarity, B. S. (2019). Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors. *Nat Commun*, 10(1), 5222. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13007-6>
- Weber, E. W., Parker, K. R., Sotillo, E., Lynn, R. C., Anbunathan, H., Lattin, J., Good, Z., Belk, J. A., Daniel, B., Klysz, D., Malipatlolla, M., Xu, P., Bashti, M., Heitzeneder, S., Labanieh, L., Vandris, P., Majzner, R. G., Qi, Y., Sandor, K., . . . Mackall, C. L. (2021). Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science*, 372(6537). <https://doi.org/10.1126/science.aba1786>
- Wei, G. H., Liu, D. P., & Liang, C. C. (2005). Chromatin domain boundaries: insulators and beyond. *Cell Res*, 15(4), 292-300.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290298>
- Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., & Storb, R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 300(19), 1068-1073.
<https://doi.org/10.1056/NEJM197905103001902>
- Wen, W., Quan, Z. J., Li, S. A., Yang, Z. X., Fu, Y. W., Zhang, F., Li, G. H., Zhao, M., Yin, M. D., Xu, J., Zhang, J. P., Cheng, T., & Zhang, X. B. (2021). Effective control of large deletions after double-strand breaks by homology-directed repair and dsODN insertion. *Genome Biol*, 22(1), 236. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02462-4>
- Wen, W., & Zhang, X. B. (2022). CRISPR-Cas9 gene editing induced complex on-target outcomes in human cells. *Exp Hematol*, 110, 13-19.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2022.03.002>
- Wenes, M., Jaccard, A., Wyss, T., Maldonado-Perez, N., Teoh, S. T., Lepez, A., Renaud, F., Franco, F., Waridel, P., Yacoub Maroun, C., Tschumi, B., Dumauthioz, N., Zhang, L., Donda, A., Martin, F., Migliorini, D., Lunt, S. Y., Ho, P. C., & Romero, P. (2022). The mitochondrial pyruvate carrier regulates memory T cell differentiation and antitumor function. *Cell Metab*, 34(5), 731-746 e739.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.03.013>
- Westin, J. R., Kersten, M. J., Salles, G., Abramson, J. S., Schuster, S. J., Locke, F. L., & Andreadis, C. (2021). Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T

- cell therapies in patients with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: Observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials. *Am J Hematol*, 96(10), 1295-1312. <https://doi.org/10.1002/ajh.26301>
- Wiebking, V., Lee, C. M., Mostrel, N., Lahiri, P., Bak, R., Bao, G., Roncarolo, M. G., Bertaina, A., & Porteus, M. H. (2021). Genome editing of donor-derived T-cells to generate allogenic chimeric antigen receptor-modified T cells: Optimizing alphabeta T cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 106(3), 847-858. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.233882>
- Wu, J., Zou, Z., Liu, Y., Liu, X., Zhangding, Z., Xu, M., & Hu, J. (2022). CRISPR/Cas9-induced structural variations expand in T lymphocytes in vivo. *Nucleic Acids Res*, 50(19), 11128-11137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac887>
- Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C. A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C. J., Gee, A. P., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Savoldo, B., & Dotti, G. (2014). Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*, 123(24), 3750-3759. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-552174>
- Yasukawa, M., Ohminami, H., Arai, J., Kasahara, Y., Ishida, Y., & Fujita, S. (2000). Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans. *Blood*, 95(7), 2352-2355. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733506>
- Yu, A. M., & McVey, M. (2010). Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic Acids Res*, 38(17), 5706-5717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq379>
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>
- Zhang, L., Morgan, R. A., Beane, J. D., Zheng, Z., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Nahvi, A. V., Ngo, L. T., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Feldman, S. A., Toomey, M. A., Kerkar, S. P., Restifo, N. P., Yang, J. C., & Rosenberg, S. A. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 21(10), 2278-2288. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2085>
- Zhang, S., Gu, C., Huang, L., Wu, H., Shi, J., Zhang, Z., Zhou, Y., Zhou, J., Gao, Y., Liu, J., Leng, Y., Liu, X., Zhang, Q., Huang, L., Tong, X., Young, K. H., Li, J., Zhu, H., & Zhang, T. (2022). The third-generation anti-CD30 CAR T-cells specifically homing to the tumor and mediating powerful

- antitumor activity. *Sci Rep*, 12(1), 10488.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14523-0>
- Zhang, Z., Qiu, S., Zhang, X., & Chen, W. (2018). Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. *BMC Biotechnol*, 18(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0419-0>
- Zhao, Y., Moon, E., Carpenito, C., Paulos, C. M., Liu, X., Brennan, A. L., Chew, A., Carroll, R. G., Scholler, J., Levine, B. L., Albelda, S. M., & June, C. H. (2010). Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res*, 70(22), 9053-9061.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2880>
- Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S. J. C., Perna, F., Kloss, C. C., Gunset, G., Plotkin, J., & Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*, 28(4), 415-428.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.004>
- Zheng, W., O'Hear, C. E., Alli, R., Basham, J. H., Abdelsamed, H. A., Palmer, L. E., Jones, L. L., Youngblood, B., & Geiger, T. L. (2018). PI3K orchestration of the in vivo persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells. *Leukemia*, 32(5), 1157-1167.
<https://doi.org/10.1038/s41375-017-0008-6>
- Zhou, G., & Levitsky, H. (2012). Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape. *Clin Dev Immunol*, 2012, 124187. <https://doi.org/10.1155/2012/124187>
- Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci*, 21(21).
<https://doi.org/10.3390/ijms21218011>