



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**TESIS DOCTORAL**

**Mejora de la Inmunoterapia CAR frente a neoplasias  
tipo B refractarias mediante edición genómica**

Marina Cortijo Gutiérrez

Directores de tesis:

Dr. Francisco Martín Molina

Dr. Karim Benabdellah

Granada, enero de 2024



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

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Marina Cortijo Gutiérrez  
ISBN: 978-84-1195-275-0  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/91038>



La doctoranda / *The doctoral candidate* **Marina Cortijo Gutiérrez** y los directores de la tesis / *and the thesis supervisors:* Dr. **Francisco Martín Molina** y / *and* Dr. **Karim Benabdellah**.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la 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 the 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, 16 de enero de 2024

Directores de tesis  
*Thesis supervisors:*

Doctorando  
*Doctoral candidate:*

Francisco Martín Molina

Karim Benabdellah

Marina Cortijo Gutiérrez



## 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:**

**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 ProteinDocks. *Pharmaceutics*. 2021 Aug 6;13(8):1217. doi: 10.3390/pharmaceutics13081217. PMID:34452178; PMCID: PMC8401568.

## 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 Biomedicina de la Universidad de Aarhus (Dinamarca) bajo la supervisión del Dr. Rasmus O. Bak. Esta estancia se realizó desde el 15 de febrero hasta el 15 de mayo de 2023, y fue financiada por el programa EMBO (European Molecular Biology Organization) para estancias cortas.

- **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

- Tristán-Manzano M, Maldonado-Pérez N, Justicia-Lirio P, **Cortijo-Gutiérrez M**, Tristán-Ramos P, Blanco-Benítez C, Pavlovic K, Aguilar-González A, Muñoz P, Molina-Estevez FJ, Griesche V, Marchal JA, Heras SR, Benabdellah K, Martin F. Lentiviral vectors for inducible, transactivator-free advanced therapy medicinal products: Application to CAR-T cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023 Mar 28; 32:322-339. doi: 10.1016/j.omtn.2023.03.018. PMID: 37125150; PMCID: PMC10141506.
- Maldonado-Pérez N, Tristán-Manzano M, Justicia-Lirio P, Martínez-Planes E, Muñoz P, Pavlovic K, **Cortijo-Gutiérrez M**, Blanco-Benítez C, Castella M, Juan M, Wenes M, Romero P, Molina-Estévez FJ, Marañón C, Herrera C, Benabdellah K and Martin F. 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.2022.1011858

- Tristán-Manzano M, Maldonado-Pérez N, Justicia-Lirio P, Muñoz P, **Cortijo-Gutiérrez M**, Pavlovic K, Jiménez-Moreno R, Nogueras S, Carmona MD, Sánchez-Hernández S, Aguilar-González A, Castilla 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.
- Pavlovic K, Tristán-Manzano M, Maldonado-Pérez N, **Cortijo-Gutierrez 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. *FrontImmunol.* 2020 Sep 4; 11:2044. doi: 10.3389/fimmu.2020.02044. PMID: 33013864; PMCID: PMC7498544.
- Aheget H, Tristán-Manzano M, Mazini L, **Cortijo-Gutierrez M**, Galindo-Moreno P, Herrera C, Martin F, Marchal JA, Benabdellah K. Exosome: A New Player in Translational Nanomedicine. *JClin Med.* 2020 Jul 26;9(8):2380. doi: 10.3390/jcm9082380. PMID: 32722531; PMCID: PMC7463834.
- 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.
- Sánchez-Hernández S, Gutierrez-Guerrero A, Martín-Guerra R, **Cortijo-Gutierrez M**, Tristán-Manzano M, Rodriguez-Perales S, Sanchez L, Garcia-Perez JL, Chato-Astrain J, Fernandez-Valades R, Carrillo-Galvez AB, Anderson P, Montes R, Real PJ, Martin F, Benabdellah K. The IS2Element Improves Transcription Efficiency of Integration-Deficient Lentiviral Vector Episomes. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018 Dec 7; 13:16-28. doi: 10.1016/j.omtn.2018.08.007. Epub 2018Aug 18. PMID: 30227274; PMCID: PMC6141704.

## 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**).

Es un centro cualificado para realizar de manera cómoda y exitosa el proyecto aquí presentado puesto que dota de salas de cultivos de un nivel de seguridad II donde poder llevar a cabo la producción de virus y la edición genómica y posterior mantenimiento de los cultivos celulares. Consta de Servicios generales como, por ejemplo: Genómica, Bioinformática, Unidad de microscopía y Citometría.

Este proyecto de tesis doctoral previamente presentado encuadra dentro de una línea prioritarias del grupo de investigación de Terapia Celular Génica: desarrollo de nuevas aproximaciones de inmunoterapia con células T-CARs para el tratamiento de leucemias refractarias. Siendo financiada esta línea por los proyectos **PI18/00330** (Dr. Karim Benabdellah), **PI21/00298**, **PMPTA22/00060** y **PECART-0031-2020** (Dr. Francisco Martin), así como por las redes COST **GenHumDi** (Dr. Karim Benabdellah) y **TerAv** RD21/0017/0004 (Dr. Francisco Martin). Esta línea además cuenta con el apoyo de la Iniciativa Andaluza de Terapias Avanzadas (IATA) identificando esta línea de investigación como una línea prioritaria para el desarrollo de la comunidad andaluza y a nuestro propio grupo como fundamental para llevarla a cabo debido a nuestra experiencia en la edición genómica.

Durante el periodo de tesis, Marina disfrutó de un contrato de garantía juvenil del Ministerio de Ciencia e Innovación (Código Expediente: PEJ-2018-001760-A) desde enero de 2019 hasta enero del 2022. Desde el año 2022 hasta finales del 2023, la estudiante ha disfrutado de un contrato predoctoral a través del proyecto PECART-0031-2020. Hasta finalizar la tesis, disfruta de un contrato asociado al proyecto PMPTA22/00060.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>22</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>37</b>
<b>1. INMUNOLOGÍA</b>	<b>37</b>
1.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO	37
1.2 LINFOCITOS T	38
1.2.1 ESTADOS, DIFERENCIACIÓN Y FENOTIPO	41
1.2.2 CAPACIDAD LÍTICA	44
1.3 MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS T	45
1.3.1 COMPLEJO DEL TCR (PRIMERA SEÑAL)	45
1.3.2 MOLECULAS CO-ESTIMULADORAS Y SU FUNCIÓN (SEGUNDA SEÑAL)	46
1.3.3 SINAPSIS INMUNOLÓGICA (SEÑAL 1 Y SEÑAL 2)	47
1.3.4 PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T	47
1.3.4.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PRIMERA SEÑAL (TCR-MHC-antígeno)	48
1.3.4.1.1 Vía del calcio-NFAT	49
1.3.4.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA SEGUNDA SEÑAL (CO-RECEPTORES)	49
1.3.4.2.1 Vía PI3K/AKT/mTOR	49
1.3.4.2.2 NFkB	50
1.3.4.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA TERCERA SEÑAL (CO-RECEPTORES)	51
1.3.4.3.1 JAK/STAT	51
1.3.4.3.2 T-box/Eomes	51
1.3.5 CAMBIOS METABÓLICOS EN LAS CÉLULAS T	52
1.3.5.1 RESPIRACIÓN INTRACELULAR	53
1.3.5.2 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	56
1.3.5.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LOS ESTADOS DE ACTIVACIÓN EN CÉLULAS T	56
1.3.5.4 INTERACCIÓN INMUNOMETABÓLICA EN EL CÁNCER	58
1.4 DISFUNCIÓN Y AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T	59
1.4.1 AGOTAMIENTO Y MARCADORES	60
1.4.2 INHIBIDORES DE PUNTO DE CONTROL INMUNOLÓGICO E INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL	61
1.4.3 EJE PD-1 / PD-L1	63
1.5 PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA RESPUESTA INMUNITARIA	65
1.6 IL15	68
1.6.1 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE IL-15	69
1.6.2 EFECTOS DE IL-15 SOBRE LAS CÉLULAS T	69
<b>2. IINMUNOTERAPIA Y CÁNCER</b>	<b>71</b>
2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA INMUNOTERAPIA	72
2.2. INMUNOESCAPE TUMORAL	73
2.3. ESTRATEGIAS DE INMUNOTERPIA TUMORAL ACTUALES	77
2.3.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES	77
2.3.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL EJE PD-1/PD-L1	77
2.3.3. CITOCINAS E INTERFERONES	78
2.3.4. IL-15	79
2.4. TERAPIA CELULAR ADOPTIVA (TCA)	80
<b>3. TERAPIA GÉNICA</b>	<b>85</b>

3.1.	INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA GÉNICA: ADICIÓN GÉNICA VERSUS EDICIÓN GENÓMICA	85
3.2.	VECTORES: ENTREGA DEL MATERIAL GENÉTICO O DE LOS MODIFICADORES DEL GENOMA	86
3.2.1.	VECTORES VIRALES	87
3.2.1.1.	VIRUS ADENOASOCIADOS	87
3.2.1.2.	LENTIVIRUS	88
3.2.2.	MÉTODOS NO VIRALES	91
3.2.2.1.	MÉTODOS FÍSICOS	91
3.2.2.2.	MÉTODOS QUÍMICOS	92
3.3.	EDICIÓN GENÓMICA (EG)	92
3.3.1.	MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN	93
3.3.2.	ENDONUCLEASAS ESPECÍFICAS	95
3.3.3.	ESTRATEGIAS KNOCK-OUT (KO)	98
3.3.4.	ESTRATEGIAS KNOCK IN (KI)	99
3.3.5.	MÉTODOS DE ENTREGA PARA EDICIÓN GENÓMICA	100
<b>4.</b>	<b>TERAPIAS CAR-T</b>	<b>102</b>
4.1.	RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CAR)	102
4.2.	PRODUCCIÓN DE CÉLULAS CAR-T	105
4.2.1.	SELECCIÓN CELULAR	105
4.2.2.	GENERACIÓN DE CÉLULAS CAR	106
4.2.3.	INFUSIÓN EN EL PACIENTE	107
4.3.	PRODUCTOS COMERCIALES TERAPIA CAR-T	108
4.4.	LIMITACIONES DE LA TERAPIA CAR DEBIDO A LA EVASIÓN TUMORAL	111
4.5.	NUEVAS ESTRATEGIAS CAR	114
4.5.1.	ADICIÓN GÉNICA	114
4.5.1.1.	TRUCKS O CAR-T DE 4TA GENERACIÓN	114
4.5.1.2.	OTRAS ESTRATEGIAS	118
4.5.2.	EDICIÓN GENÓMICA	123
	<b>HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>126</b>
	<b>OBJETIVOS</b>	<b>129</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>131</b>
<b>1.</b>	<b>CULTIVO CELULAR</b>	<b>131</b>
1.1	LÍNEAS CELULARES	131
1.2	CÉLULAS T PRIMARIAS HUMANAS	131
<b>2.</b>	<b>PLÁSMIDOS, VECTORES LENTIVIRALES Y ADENOASOCIADOS</b>	<b>132</b>
2.1.	VECTORES LENTIVIRALES INTEGRATIVOS	132
2.2.	VECTORES LENTIVIRALES NO INTEGRATIVOS (IDLVS)	132
2.3.	VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV)	133
<b>3.</b>	<b>PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES Y TITULACIÓN</b>	<b>133</b>
3.1.	MAXI-PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	133
3.2.	PRODUCCIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES	134
3.3.	TITULACIÓN	134
3.4.	ESTIMACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES DISPONIBLES EN EL SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE EMPAQUETAMIENTO	135
3.5.	ESTIMACIÓN DEL GENOMA DEL VECTOR VIRAL IDLV	135
<b>4.</b>	<b>MODIFICACIÓN GENÉTICA</b>	<b>136</b>
4.1.	TRANSDUCCIÓN CELULAR	136
4.2.	EDICIÓN GENÓMICA	136

<b>5. ANÁLISIS DE LAS EDICIONES GENERADAS</b>	<b>137</b>
5.1. EDICIONES EN EL LOCUS DIANA ( <i>ON-TARGET</i> )	137
5.2. EDICIONES FUERA DEL LOCUS DIANA ( <i>OFF-TARGET</i> )	138
<b>6. EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA (qPCR)</b>	<b>139</b>
<b>7. FRECUENCIAS DE EDICIÓN DE ALELOS MEDIANTE ddPCR</b>	<b>140</b>
<b>8. PURIFICACIÓN DE ADNsc</b>	<b>141</b>
8.1. MEDIANTE KIT COMERCIAL	141
8.2. PROTOCOLO MANUAL	141
<b>9. CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>142</b>
9.1. DETECCIÓN DEL CAR	142
9.2. DETECCIÓN DE hIL-15	142
9.3. ESTUDIO DEL FENOTIPO Y AGOTAMIENTO DE LAS CÉLULAS EDITADAS	142
9.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS RATÓN/HUMANO DEL MODELO <i>IN VIVO</i>	143
<b>10. ESTUDIOS FUNCIONALES</b>	<b>143</b>
<b>11. MODELO ANIMAL</b>	<b>144</b>
<b>12. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA</b>	<b>145</b>
<b>13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>146</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>148</b>
<b>1. PUESTA A PUNTO DE LOS SISTEMAS DE EDICIÓN GENÓMICA EN EL LOCUS PDCD1 EN CÉLULAS T PRIMARIAS</b>	<b>148</b>
1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA GENERACIÓN DE DSB EN EL LOCUS DE PD-1	148
1.2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA GENERACIÓN DE DSBs	150
<b>2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CAR-T PD-1 KO</b>	<b>152</b>
2.1. COMBINACIÓN DE LA EDICIÓN GENÓMICA CON VECTORES LENTIVIRALES PARA GENERAR CÉLULAS CAR-T PD-1 KO	153
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO ANTES DE SER ENFRENTADAS AL TUMOR: PROLIFERACIÓN, FENOTIPO Y METABOLISMO	155
2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y FENOTIPO DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO	155
2.2.2. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO	157
<b>3. ACTIVIDAD LÍTICA DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO FRENTE A CÉLULAS TUMORALES PDL1+</b>	<b>159</b>
3.1. GENERACIÓN DE UN MODELO CELULAR DONDE INVESTIGAR EL EJE PD-1/PD-L1 EN EL ÁMBITO DE LA TERAPIA CAR	159
3.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO GENERADO NAMALWA PD-L1+	160
3.2.1. <i>IN VITRO</i>	160
3.2.2. <i>IN VIVO</i>	161
3.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA, FENOTIPO Y PERSISTENCIA DE CÉLULAS CAR-T PD-1 KO Y CÉLULAS CAR-T WT FRENTE A CÉLULAS NAMALWA PD-L1+	162
<b>4. DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA GENERAR CÉLULAS CAR-T PD-1 KO SECRETORAS DE IL-15 TRAS ACTIVACIÓN</b>	<b>165</b>
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA INSERCIÓN ESPECÍFICA DE ADN EN LOCUS ESPECÍFICOS DE CELULAS T (KI)	165
4.1.1. COMPARATIVA DE MÉTODOS DE ENTREGA DEL ADN DONADOR	165

4.1.2.	MODIFICACIONES DE LOS IDLVs PARA SU APLICACIÓN COMO VECTOR DE ENTREGA EN LA ESTRATEGIA KI	169
4.2.	GENERACIÓN DE CÉLULAS pdTRUCKIL-15	172
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPO, PROLIFERACIÓN Y METABOLISMO DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15 ANTES DE ENFRENTARLAS A TUMOR	175
4.3.1.	CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15	175
4.3.2.	ESTUDIO METABÓLICO DE CÉLULAS pdTRUCKIL-15	176
4.4.	ESTUDIO DE ESTRATEGIA KI CON ADNcs MÉTODO VIRAL VS NO VIRAL	179
<b>5.</b>	<b>ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTILEUCÉMICA DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15 FRENTE A LAS CÉLULAS NAMALWA PD-L1+</b>	<b>181</b>
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>186</b>
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>200</b>
<b>CONCLUSIONS</b>		<b>202</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>204</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Esquema representativo de los estadios de diferenciación de los linfocitos T. _____	44
Figura 2. Esquema representativo de las principales rutas de señalización en linfocitos T. ____	48
Figura 3. Relación entre metabolismo y rutas de señalización de los linfocitos T. _____	53
Figura 4. Esquema representativo de la respiración celular y mitocondrial. _____	55
Figura 5. Características metabólicas de las diferentes subpoblaciones de los linfocitos T. ____	58
Figura 6. Esquema representativo del agotamiento de los linfocitos T. _____	60
Figura 7. Esquema representativo la función de los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICB) en los linfocitos T. _____	62
Figura 8. Esquema representativo de los efectos ejercidos por el eje PD-1/PD-L1 sobre los linfocitos T en el TME. _____	64
Figura 9. Principales características y señalización de receptores de citocinas de la familia $\gamma$ c (IL-2, IL-15), IL-12 e IL-18. _____	66
Figura 10. Inmunoterapia. _____	71
Figura 11. Principales mecanismos del inmunoescape tumoral ejercidos por el TME. _____	74
Figura 12. Esquema representativo de la terapia génica-celular. _____	86
Figura 13. Desglose global de las diversas rutas de reparación del material genético (ADN) tras la generación de roturas de doble cadena inducidas por endonucleasas específicas. _____	95
Figura 14. Estructura y generaciones de los CAR. _____	105
Figura 15. Proceso clínico de la terapia CAR. _____	108
Figura 16. Nuevas estrategias CAR más destacadas. _____	122
Figura 17. Esquema representativo de la estrategia de knock-out (KO) de PD-1. _____	148
Figura 18. El guía 3 es el más eficaz para generar células t PD-1 KO. _____	150
Figura 19. Estudio de la seguridad de edición del gen PDCD1 con el ARNg3. _____	151
Figura 20. Estructura del CAR ARI-0001 y efectos del eje PD-1 / PD-L1. _____	152
Figura 21. La expresión del CAR no afecta a la edición del gen PDCD1. _____	154
Figura 22. Las células CAR-T PD-1 KO muestran inducción hacia poblaciones memoria, pero no una reducción en los marcadores de agotamiento ni mayores capacidades proliferativas tras tres días de activación celular con nanomatriz $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28. _____	156
Figura 23. Las células CAR-T PD-1 KO muestran características metabólicas memoria, pero una peor capacidad respiratoria disponible tras tres días de activación celular con nanomatriz $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28. _____	158
Figura 24. Generación y caracterización de líneas celulares tumorales Namalwa PD-L1+. ____	159
Figura 25. Caracterización in vitro de líneas celulares tumorales Namalwa PD-L1+. _____	160
Figura 26. Caracterización in vivo de líneas celulares tumorales Namalwa PD-L1+. _____	162
Figura 27. Las células CAR-T PD-1 KO muestran una mayor capacidad lítica que las células CAR-T WT frente a las células diana PD-L1+. _____	164
Figura 28. Esquema representativo de las estrategias de knock-in para edición genómica. ____	166
Figura 29. Eficiencia de integración de cada vector de entrega utilizado en el estudio. ____	168
Figura 30. El uso de las secuencias genéticas estudiadas no mejoran las capacidades de los IDLVs como vectores de entrega génica. _____	172
Figura 31. Se consigue eficacia knock-in de IL-15 junto con una expresión inducida por el promotor endógeno de PD-1 en las células T editadas tras tres días de activación celular con nanomatriz $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28. _____	174

Figura 32. Las células pdTRUCKIL-15 muestran una inducción hacia poblaciones memoria y potencial anti-apoptótico tras tres días de activación celular con nanomatriz $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.	176
Figura 33. Las células pdTRUCKIL-15 muestran características metabólicas memoria junto con una mejor capacidad respiratoria disponible que las células CAR-T PD1 KO tras tres días de activación celular con nanomatriz $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.	178
Figura 34. La técnica de KI para pdTRUCKIL-15 con ADNcs como donador del transgén no consigue la misma eficiencia de edición genómica que con AAV6.	180
Figura 35. Lisis y persistencia mejoradas en células T pdTRUCKIL-15 dirigidas a células PD-L1+.	184

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Lista de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a ICB aprobados por la FDA	84
Tabla 2. Tabla comparativa y descriptiva de las características de las endonucleasas.	98
Tabla 3. Lista de terapias CAR-T aprobadas por la FDA.	111
Tabla 4. Listado de ensayos en los que se utiliza la combinación de IL-15 con la terapia CAR	118
Tabla 5. Secuencias de los guías y oligonucleótidos empleados en la edición genómica del locus de PDCD1 y su análisis.	139
Tabla 6. Información sobre las secuencias de los oligonucleótidos empleados en el análisis de edición genómica de KI para generar células pdTRUCKIL-15.	140
Tabla 7. Información sobre las secuencias de los oligonucleótidos y sondas empleados en el análisis de integración específica del transgén en el locus PDCD1.	141



## RESUMEN

---

La terapia celular adoptiva (TCA) con células T genéticamente modificadas que expresan **receptores antigénicos quiméricos (CAR)** ha surgido como una opción prometedora para pacientes con **leucemia o linfoma refractario**. A pesar de su éxito en malignidades de tipo B, la terapia con células CAR-T aún enfrenta desafíos como la toxicidad, la inactivación por el microentorno tumoral (**TME**) y una baja **persistencia** celular en los pacientes. En este sentido, el **eje PD1/PD-L1** juega un papel crucial en muchos tipos de tumores. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de una estrategia de edición genómica (EG) que permita generar células CAR-T capaces de superar los frenos generados por la expresión de PD-L1 en las células tumorales. El primer abordaje fue eliminar PD-1 en las células CAR-T y realizar un estudio en detalle de sus características fenotípicas y metabólicas. El CAR utilizado en esta tesis doctoral, el **CAR ARI-0001**, proviene de una colaboración con el Dr. Manel Juan y es un CAR de segunda generación específico para **CD19**.

Para llevar a cabo la **eliminación de PD-1** en estas células CAR-T, realizamos la edición genómica del exón 1 mediante el sistema CRISPR/Cas9, entregado como **ribonucleoproteína (RNP)**. Mediante esta estrategia, hemos obtenido una depleción altamente eficiente (80%) de PD-1 sin alteraciones significativas en el fenotipo de las células T y sin generación de grandes deleciones. Tras realizar las caracterizaciones celulares y metabólicas de las células CAR-T PD-1 KO, los datos muestran que la edición de PD-1 da lugar a una capacidad proliferativa reducida junto a una menor capacidad respiratoria disponible (SRC), indicador del potencial oxidativo máximo de la mitocondria disponible para la producción de energía. Sin embargo, a su vez, está induciendo a los linfocitos T hacia poblaciones memoria. Además, estas células CAR-T PD-1 KO presentan una mayor persistencia y eficiencia lítica cuando son co-cultivadas con las células tumorales diana expresoras de PD-L1 en comparación con las células CAR-T WT, aunque la expresión de los marcadores de agotamiento permanece invariable tras estos experimentos. Estos datos sugieren que, aunque la edición de PD-1 mejora la capacidad de persistencia de las células CAR-T en presencia de PD-L1 provoca, a su vez, una reducción del *fitness* (capacidad proliferativa y empeoramiento metabólico) que deben ser mejorados.

En base a estos resultados propusimos que, además de eliminar PD-1, necesitábamos una expresión controlada de ciertos factores que mejoren el *fitness* celular, para lo cual nos centramos en la **citocina IL-15**. La interleucina-15 (IL-15) desempeña un papel crucial en la

respuesta citotóxica contra células tumorales entre las que se encuentran la mejora de la proliferación y metabolismo de las células T. Sin embargo, debido a su alta actividad biológica en múltiples dianas, es importante controlar su expresión. Nos propusimos, por tanto, generar una plataforma basada en CRISPR/Cas9 – recombinación homóloga (**HDR**) para expresar el gen de interés (IL-15, otras citocinas, anticuerpos, etc) en el locus *PDCD1*. Esto podría permitir no sólo eliminar PD-1, sino expresar genes que potenciaron aún más la actividad de las células CAR-T. Además, estos genes potenciadores se expresarían siguiendo el patrón del gen *PDCD1*, consiguiendo de esta manera una **expresión controlada** de la misma, evitando los efectos negativos derivados de una expresión constitutiva.

Para llevar a cabo este objetivo, en primer lugar, se evaluaron diferentes estrategias de entrega del ADN donador (**IDLVs, AAVs, ADN-productos de PCR y ADNcs**) e incluso se realizaron diferentes optimizaciones de los IDLVs utilizando un donador expresando el gen reportero eGFP a través de un promotor fuerte y dirigido a un locus (*TRAC*) que nos permitiera evaluar la eficacia y seguridad fácilmente. Los resultados mostraron que los AAV6 son los mejores vectores para entregar los ADN donadores a las células T primarias, con eficiencias que rondaban el 60% de integraciones específicas en el producto pdTRUCKIL-15 generado. Por lo tanto, se concluyó que la plataforma para generar estos CAR-T PD-1 KO de 4ª generación sería mediante el uso de RNPs para entregar la endonucleasa CRISPR/Cas9 y **AAV6** para entregar el ADNc de IL-15 en el locus *PDCD1* para generar células pdTRUCKIL-15.

Una vez generadas las células pdTRUCKIL-15 determinamos que, tal y como era esperado, IL-15 se expresaba siguiendo el perfil de expresión de PD-1. Además, evaluamos el impacto de la eliminación de PD-1 junto con la expresión controlada de IL-15 en el fenotipo, la proliferación, la capacidad respiratoria, expresión de proteínas anti-apoptóticas y la actividad lítica de las células pdTRUCKIL-15. Nuestros resultados demostraron en todos los casos que **la expresión de IL-15 revierte por completo la deficiencia proliferativa de las células CAR-T PD-1 KO**, observándose una disminución en la expresión de BIM (proteína pro-apoptótica) y un aumento en la expresión de Bcl-xL (proteína anti-apoptótica). Por otro lado, el producto pdTRUCKIL-15 muestra un incremento en las poblaciones memoria además de características metabólicas mejoradas en términos de SRC respecto de las células CAR-T PD-1 KO. Además, las células pdTRUCKIL-15 presentaron una mayor capacidad lítica que las células CAR-T PD-1 KO y CAR-T WT cuando son co-cultivadas con las células diana PD-L1+, aunque la diferencia es significativa únicamente frente a las células CAR-T WT.

En resumen, en esta tesis doctoral hemos demostrado que la eliminación de PD-1 en las células CAR-T mejora su actividad lítica frente a células tumorales PD-L1+, pero además puede reducir su potencial metabólico y su actividad proliferativa. Sin embargo, hemos demostrado que la expresión controlada de IL-15 revierte estas dos deficiencias, confiriendo a las células pdTRUCKIL-15 una mayor capacidad para resistir las condiciones desafiantes del microentorno tumoral, asegurando su supervivencia y persistencia prolongadas. En última instancia, esta estrategia presentada como una **plataforma de edición genómica para generar TRUCKS PD-1 KO**, representa un avance significativo en la ingeniería de células CAR-T, allanando el camino para futuras terapias más efectivas y duraderas en el tratamiento de la leucemia, el linfoma y otras malignidades hematológicas refractarias.



# ABSTRACT

---

**Adoptive Cell Therapy (ACT)** with genetically modified T cells expressing **Chimeric Antigen Receptor (CAR)** has emerged as a promising option for patients with **refractory leukemia or lymphoma**. Despite its success in B-cell malignancies, CAR-T cell therapy still faces challenges such as toxicity, inactivation by the tumour microenvironment (**TME**), and low cell **persistence** in patients. In this context, the **PD-1/PD-L1 axis** plays a crucial role in various tumour types. The main aim of this Doctoral Thesis is to develop a gene editing (GE) strategy to generate CAR-T cells capable of overcoming inhibitory signals induced by PD-L1 expression in tumor cells. The initial approach involved PD-1 deletion in CAR-T cells, with a detailed characterization of their phenotypic and metabolic features. The CAR utilized in this Thesis, CAR ARI-0001, is a second-generation CAR specific for CD19, developed in collaboration with Dr. Manel Juan.

**PD-1 elimination** was achieved through **CRISPR/Cas9** ribonucleoprotein (RNP) delivery targeting exon 1 of *PDCD1* gene. The study demonstrates that CRISPR/Cas9 delivered as **RNP** enables highly efficient PD-1 depletion (80%) without significant alterations in T cell phenotype or generating large deletions. Subsequent cellular and metabolic characterizations of CAR-T PD-1 KO cells revealed a reduced proliferative capacity and lower available respiratory capacity (SRC), indicating a decreased mitochondrial oxidative potential. However, PD-1 editing induced T cells toward memory populations. Additionally, CAR-T PD-1 KO cells exhibited enhanced persistence and cytotoxicity capacity when were co-cultured with PD-L1-expressing target tumor cells compared to CAR-T WT cells, although expression of exhaustion markers remained consistent. These findings suggest that while PD-1 editing improves CAR-T cell persistence in the presence of PD-L1, it simultaneously induces a fitness reduction (proliferative capacity and metabolic impairment) that needs to be improved.

Based on these results, it was proposed that, in addition to PD-1 elimination, controlled expression of some soluble factors enhancing fitness is needed like an additional step in the GE strategy, focusing on the **cytokine IL-15**. IL-15 plays a crucial role in the cytotoxic response against tumor cells, including improving T cell proliferation and metabolism. Due to its high biological activity across multiple targets, controlling its expression is essential. Therefore, a CRISPR/Cas9 – Homology-Directed Repair (**HDR**) platform was aimed at expressing a gene of interest (IL-15, other cytokines, antibodies, etc.) at the PD-1 locus. This platform could allow not only PD-1 abrogation but also the expression of genes further enhancing CAR-T cell activity.

Additionally, these enhancing genes would be expressed following the PD-1 gene pattern, ensuring a **controlled expression** and avoiding the negative effects from constitutive expression.

To achieve this objective, various DNA donor delivery strategies (**IDLVs, AAVs, PCR product DNA, and ADNcs**) were evaluated, and optimizations of IDLVs were performed using an eGFP-expressing donor through a strong promoter directed to a locus (TRAC). The results showed that AAV6 was the most efficient vector for delivering DNA donors to primary T cells, with efficiencies around 60% for specific integrations in the generated pdTRUCKIL-15 T cell product. Consequently, the platform for generating these 4th generation CAR-T PD-1KO would use RNPs for CRISPR/Cas9 delivery and **AAV6** for IL-15 ADNc delivery to *PDCD1* locus to generate pdTRUCKIL-15 cells.

Once pdTRUCKIL-15 cells were generated, it was determined that IL-15 expression followed the PD-1 expression profile. Furthermore, the impact of PD-1 deletion and controlled IL-15 expression on the phenotype, proliferation, respiratory capacity, anti-apoptotic proteins, and lytic activity of pdTRUCKIL-15 cells was evaluated. Results demonstrated that **IL-15 expression completely reversed the proliferative deficiency of CAR-T PD-1 KO cells**, with a decrease in BIM (pro-apoptotic protein) expression and an increase in Bcl-xL (anti-apoptotic protein) expression.

Moreover, pdTRUCKIL-15 cells exhibited an increase in memory populations together with and improved metabolic characteristics in terms of SRC rates (a crucial feature for longevity, persistence, and effective lytic function) compared to CAR-T PD-1 KO cells. Additionally, pdTRUCKIL-15 cells showed higher lytic capacity than CAR-T PD-1 KO and CAR-T WT cells, although the difference was significant only against CAR-T WT cells.

In summary, this Thesis demonstrates that PD-1 deletion in CAR-T cells enhances their activity against PD-L1+ tumour cells but may also reduce their metabolic potential and proliferative activity. Furthermore, controlled expression of IL-15 reverses these two deficiencies, endowing pdTRUCKIL-15 cells with a greater ability to withstand the challenging conditions of the tumor microenvironment, ensuring a prolonged survival and persistence. Ultimately, the presented **strategy as a genomic editing platform to generate PD-1 KO TRUCKS represents a significant advance in CAR-T cell engineering**, paving the way for more effective and durable therapies in the treatment of leukemia, lymphoma, and other refractory hematologic malignancies.



## ABREVIATURAS

---

<b>AAV</b>	Virus Adeno-asociado, del inglés <i>Adeno-Associated Virus</i>
<b>Acetil-CoA</b>	Acetil coenzima A
<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos del inglés <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADNcs</b>	ADN de cadena simple
<b>ADNdc</b>	ADN de doble cadena
<b>ADNg</b>	ADN genómico
<b>AEMPS</b>	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
<b>AG</b>	Adición génica
<b>AICD</b>	Muerte celular inducida por activación, del inglés <i>Activation Induced Cell Death</i>
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B, del inglés <i>Protein Kinase B</i>
<b>Alt-EJ</b>	Unión de extremos alternativa, del inglés <i>Alternative End Joining</i>
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP, del inglés <i>AMP-activated Protein Kinase</i>
<b>AP1</b>	Complejo proteico adaptador 1, del inglés <i>Adaptor Protein Complex-1</i>
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno, del inglés <i>Antigen Presenting Cell</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico

<b>ARNcr</b>	ARN-CRISPR
<b>ARNcs</b>	ARN de cadena simple
<b>ARNg</b>	ARN guía
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNsg</b>	ARN guía único, del inglés <i>Single Guide ARN</i>
<b>ARNtracr</b>	ARN CRISPR transactivante, del inglés <i>Trans-Activating CRISPR</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato, del inglés <i>Adenosine Triphosphate</i>
<b>BATF</b>	Factor de transcripción de cremallera de leucina básica similar a ATF, del inglés <i>Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor</i>
<b>BCMA</b>	Antígeno de maduración de las células B, del inglés <i>B-Cell Maturation Antigen</i>
<b>BE</b>	Editor de bases, del inglés <i>Base Editor</i>
<b>BiTEs</b>	Anticuerpos biespecíficos de unión a células T, del inglés <i>Bi-Specific T-Cell Engagers</i>
<b>CAR</b>	Receptor de antígeno quimérico, del inglés <i>Chimeric Antigen Receptor</i>
<b>CAR-T</b>	Célula T expresando el CAR, del inglés <i>CAR-T cell</i>
<b>CCECC</b>	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
<b>CCR</b>	Carcinoma de células renales
<b>CDR</b>	Región hipervariable o determinante de la complementariedad, del inglés <i>Complementarity Determining Region</i>
<b>Células DC</b>	Células dendríticas, del inglés <i>Dendritic Cell</i>
<b>Células NK</b>	Células asesinas naturales, del inglés <i>Natural Killers</i>
<b>CF</b>	Citometría de flujo

<b>CRISPR/Cas</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas/nucleasa 9 asociada, del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR Associated Nuclease Protein 9</i>
<b>CRS</b>	Síndrome de liberación de citocinas, del inglés <i>Cytokine Release Syndrome</i>
<b>c-SMAC</b>	Centro de la sinapsis, del inglés <i>Central Supramolecular Activation Cluster</i>
<b>CTL</b>	Linfocitos T citotóxicos, del inglés <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
<b>CTLA-4</b>	Receptor asociado a linfocitos T citotóxicos, del inglés <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
<b>DLBCL</b>	Linfoma difuso de células B grandes, del inglés <i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i>
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>PCRd</b>	Reacción en cadena de la polimerasa digital, del inglés <i>Digital Polymerase Chain Reaction</i>
<b>DSB</b>	Rotura de doble cadena, del inglés <i>Double Strand Break</i>
<b>ECAR</b>	Tasa de acidificación extracelular, del inglés <i>Extracellular Acidification Rate</i>
<b>ECM</b>	Moléculas de la matriz extracelular, del inglés <i>Extracellular Matrix</i>
<b>EG</b>	Edición Genómica
<b>eGFP</b>	Proteína verde fluorescente mejorada, del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<b>EICH</b>	Enfermedad de Injerto Contra Huésped
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento, del inglés <i>European Medicines Agency</i> .
<b>Eomes</b>	Eomesodermina
<b>Fab</b>	Fragmento de unión al antígeno, del inglés <i>Fragment Antigen-Binding</i>
<b>FAO</b>	$\beta$ -oxidación de ácidos grasos, del inglés <i>Fatty Acid Oxidation</i>

<b>FDA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos, del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FL3B</b>	Linfoma folicular grado 3B, del inglés <i>Follicular Lymphoma grade 3B</i>
<b>GLUT1</b>	Transportador de glucosa 1, del inglés <i>Glucose Transporter 1</i>
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>GSH</b>	Glutación, del inglés <i>Glutathione</i>
<b>HGBL</b>	Linfoma de células B de alto grado, del inglés <i>High Grade B-Cell Lymphoma</i>
<b>HNSCC</b>	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, del inglés <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i> .
<b>HR o HDR</b>	Recombinación homóloga, del inglés <i>Homologous Direct Recombination</i>
<b>HSC</b>	Célula madre hematopoyética, del inglés <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
<b>IC</b>	Puntos de control inmunológico, del inglés <i>Immune checkpoint</i>
<b>ICANS</b>	Síndrome de neurotoxicidad asociado a células efectoras inmunes, del inglés <i>Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome</i>
<b>ICB</b>	Inhibidores de puntos de control inmunológico, del inglés <i>Immune checkpoint-Inhibitors</i>
<b>ICE</b>	Inferencia de ediciones CRISPR, del inglés <i>Inference of CRISPR Edits</i>
<b>ICOS</b>	Co-estimulador inducible, del inglés <i>Inducible T-cell Costimulator</i>
<b>IDLV</b>	Vector lentiviral deficiente para la integración, del inglés <i>Integrase-Deficient Lentiviral Vector</i>
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina

<b>ILC</b>	Células citotóxicas innatas, del inglés <i>Innate Lymphoid Cells</i>
<b>INDEL</b>	Inserción y/o eliminación de pequeñas secuencias, del inglés <i>Insertion and Deletion</i>
<b>IRF4</b>	Factor 4 regulador del interferón, del inglés <i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
<b>ITAM</b>	Motivo de activación de inmunorreceptores basados en tirosina, del inglés <i>Tyrosine-Based Activation Motif</i>
<b>ITR</b>	Repeticiones terminales invertidas, del inglés, <i>Inverted Terminal Repeat</i>
<b>JAK</b>	Factores de transcripción a través de enzimas Jano, del inglés <i>Janus Kinase</i> .
<b>KI</b>	Inserción de un gen, del inglés <i>Knock In</i>
<b>KO</b>	Disrupción de un gen, del inglés <i>Knock Out</i>
<b>LAG3</b>	Gen 3 de Activación Linfocitaria, del inglés <i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>
<b>LBCG</b>	Linfoma B de células grandes
<b>LCM</b>	Linfoma del manto
<b>LF</b>	Linfoma folicular, del inglés <i>Follicular Lymphoma</i>
<b>LH</b>	Linfoma de Hodgkin
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda De Células B
<b>LLA/LLC</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda/Crónica
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>LPL</b>	Lipasa lipoproteica, del inglés <i>Lipoprotein Lipase</i>
<b>LT</b>	Linfotoxina
<b>LTR</b>	Repeticiones largas terminales, del inglés <i>Long Terminal Repeat</i>

<b>LV</b>	Vector lentiviral, del inglés <i>Lentiviral Vector</i>
<b>M2</b>	Macrófago asociado al tumor
<b>MALT</b>	Tejido linfático asociado a las mucosas, del inglés <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1, del inglés <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
<b>MDSC</b>	Células supresoras mieloides, del inglés <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
<b>MegN</b>	Meganucleasa, del inglés <i>Meganuclease</i>
<b>MFI</b>	Intensidad media de fluorescencia, del inglés <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>MHC I</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex Class I</i>
<b>MHC II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$ , del inglés <i>Macrophage Inflammatory Protein-1<math>\alpha</math></i>
<b>MM</b>	Mieloma múltiple
<b>MMEJ</b>	Unión de extremos mediada por microhomología, del inglés <i>Microhomology-Mediated End Joining</i>
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección, del inglés <i>Multiplicity of Infection</i>
<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales, del inglés <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
<b>mTOR</b>	Diana de la rapamicina en células de mamífero, del inglés <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>

<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido en su forma reducida, del inglés <i>Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, del inglés <i>Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de las células T activadas, del inglés <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear-κB, del inglés <i>Nuclear Factor κB</i>
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos, del inglés <i>Microhomology-Mediated End Joining</i>
<b>NKG2D</b>	Receptor de activación específico de células NK del grupo 2, miembro D, del inglés, <i>Natural Killer group 2D</i>
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>NPL</b>	Nanopartícula lipídica
<b>NPP</b>	Nanopartícula de polímero
<b>NR4A</b>	Receptor Nuclear de la subfamilia 4a, del inglés <i>Nuclear Receptor Subfamily 4<sup>a</sup></i>
<b>NSCLC</b>	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas, del inglés <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
<b>OCR</b>	Tasa de consumo de oxígeno, del inglés <i>Oxygen Consumption Rate</i>
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto, del inglés <i>Open Reading Frame</i>
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación oxidativa, del inglés, <i>Oxidative Phosphorylation</i>
<b>p/s</b>	Penicilina/Estreptomina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PD-1</b>	Proteína de muerte celular programada 1 del inglés <i>Programmed Death- 1</i>
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa, del inglés <i>Pyruvate Dehydrogenase</i>

<b>PD-L1</b>	Ligando 1 de muerte programada, del inglés <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
<b>PE</b>	Re-escritores de ADN, del inglés <i>Prime Editing</i>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, del inglés <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1 Alpha</i>
<b>PGK</b>	Fosfoglicerato quinasa humana, del inglés <i>Phosphoglycerate Kinase</i>
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa, del inglés <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
<b>PIP2</b>	Fofatidilinositol 4,5-bifostato, del inglés <i>Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate</i>
<b>PIP3</b>	Fofatidilinositol 3,4,5-trifostato, del inglés <i>Phosphatidylinositol 4,5-Trisphosphate</i>
<b>PMBC</b>	Célula mononuclear de sangre periférica, del inglés <i>Peripheral Mononuclear Blood Cell</i>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C, del inglés <i>Phospholipase C</i>
<b>PMBCL</b>	Linfoma mediastínico de células B grandes primario, del inglés <i>Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma</i>
<b>p-SMAC</b>	Periferia de la sinapsis, del inglés <i>Peripheric Supramolecular Activation Cluster</i>
<b>R/R</b>	Recidivante/Refractario
<b>RCC</b>	Carcinoma de células renales, del inglés <i>Renal Cell Carcinoma</i>
<b>RI</b>	Receptor Inhibidor
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>rPAM</b>	Motivo adyacente al protospaciador, del inglés <i>Protospaced Adjacent Motif</i>
<b>S1P1R</b>	Esfingosina 1-fosfato, del inglés <i>Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1</i>

<b>SAP</b>	Proteína asociada a SLAM, del inglés <i>SLAM Associated Protein</i>
<b>SB</b>	Sleeping Beauty
<b>ScFV</b>	Fragmento variable de cadena sencilla, del inglés <i>Single-chain Variable Fragment</i>
<b>SEN</b>	Endonucleasa específica, del inglés <i>Specific Endonuclease</i>
<b>SFFV</b>	Virus formador de focos en el bazo, del inglés <i>Spleen Focus Forming Virus</i>
<b>SHP-1 y SHP-2</b>	Fosfatasas de tirosina, del inglés <i>Src Homology 2 Domain-containing Phosphatase 1 and 2</i>
<b>SI</b>	Sistema Inmunológico
<b>SMAC</b>	Sinapsis inmunitaria o cúmulo de activación supramolecular, del inglés <i>Supramolecular Activation Cluster</i>
<b>SLAM</b>	Molécula de activación de señalización linfocítica, del inglés <i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i> .
<b>SRC</b>	Capacidad respiratoria mitocondrial de repuesto, del inglés <i>Spare Respiratory Capacity</i>
<b>SSA</b>	Alineamiento de hebra simple o cadenas sencillas, del inglés <i>Single-Strand Annealing</i>
<b>STAT5</b>	Transductor de señales y activador transcripcional 5, del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
<b>TAA</b>	Antígeno asociado a tumor, del inglés <i>Tumor Associated Antigen</i>
<b>TALEN</b>	Nucleasa de actividad similar al activador de transcripción, del inglés <i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
<b>TAM</b>	Macrófagos asociados al tumor, del inglés <i>Tumoral Associated Macrophages</i>
<b>TCA</b>	Ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs, del inglés <i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
<b>TCA</b>	Terapia Celular Adoptiva

<b>T<sub>CM</sub></b>	Célula T de memoria central, del inglés <i>T Central Memory</i>
<b>TCR</b>	Receptor de células T, del inglés <i>T Cell Receptor</i>
<b>T<sub>EF</sub></b>	Célula T Efectora
<b>T<sub>EM</sub></b>	Célula T de memoria efectora, del inglés <i>T Effector Memory</i>
<b>T<sub>EX</sub></b>	Célula T exhausta o agotada
<b>TG</b>	Terapia Génica
<b>TGF-β</b>	Factor de Crecimiento Tumoral – β, del inglés <i>Transforming Growth Factor B</i>
<b>TH</b>	Linfocitos cooperadores, del inglés, <i>T Helper</i>
<b>TIGIT</b>	Inmuno-receptor con un dominio Ig y un dominio ITIM, del inglés <i>T cell immunoglobulin and ITIM Domain</i>
<b>TILs</b>	Linfocitos infiltrantes del tumor, del inglés <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
<b>TIM-3</b>	Inmunoglobulina y Dominio de Mucina 3 en Células T, del inglés <i>T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-Containing Protein 3</i>
<b>T<sub>M</sub></b>	Célula T Memoria
<b>TME</b>	Microambiente tumoral, del inglés <i>Tumoral Microenvironment</i>
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral α, del inglés <i>Tumoral Necrosis Factor alpha</i>
<b>TOX</b>	Por sus siglas, del inglés, <i>Thymocyte Selection-Associated HMG Box</i>
<b>T<sub>PEX</sub></b>	Células T con agotamiento prematuro, del inglés, <i>Precursor Exhausted T Cell</i>
<b>TRAIL</b>	Factor de necrosis tumoral, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
<b>Treg</b>	Linfocitos reguladores

<b>TRUCKs</b>	Células T redirigidas para la destrucción mediada por citocinas universales, del inglés <i>T cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing</i>
<b>T<sub>SCM</sub></b>	Célula T memoria con características similares a las células madre, del inglés <i>T Stem Cell Memory</i>
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>ZFNs</b>	Nucleasa con actividad de dedos de Zinc, del inglés <i>Zinc-Finger Nuclease</i>



# INTRODUCCIÓN

---

## 1. INMUNOLOGÍA

La **inmunología** es la rama de la biología que se dedica al estudio del **sistema inmunológico (SI)**, el cual constituye una compleja red compuesta por células, tejidos y órganos, junto con las sustancias que estos generan. La inmunología estudia: 1) cómo estos componentes interactúan y responden a las infecciones y otras agresiones externas (heridas) o internas (cáncer, procesos inflamatorios, etc), 2) cómo el SI mantiene la tolerancia a las propias células del cuerpo (previniendo enfermedades autoinmunes) y 3) cómo se puede manipular con fines terapéuticos, como en la vacunación o en la terapia celular adoptiva.

A su respuesta conjunta y coordinada tras la introducción de sustancias extrañas se le denomina **respuesta inmunitaria** [1][2].

### 1.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO

El **sistema inmunitario** o **sistema inmunológico (SI)** es un conjunto de elementos y procesos biológicos en el interior de un organismo que le permite mantener su equilibrio interno (homeostasis) frente a amenazas externas, ya sean biológicas (representadas por agentes patógenos), fisicoquímicas (como la exposición a contaminantes o radiaciones) o internas (la presencia de células cancerosas, procesos inflamatorios, etc.). Este sistema desempeña la función esencial de identificar y distinguir lo que es dañino para el organismo y **responde** ante ello, ya sea una **amenaza externa o interna**.

Como se ha mencionado anteriormente, el SI está compuesto por una red compleja de moléculas, células, tejidos y órganos que trabajan coordinados para mantener la homeostasis del organismo:

- Los órganos linfáticos se dividen en primarios y secundarios. Los **órganos linfáticos primarios**, como la **médula ósea y el timo**, son cruciales para la **maduración y desarrollo de los linfocitos B y T**, respectivamente. La médula ósea facilita la hematopoyesis y la maduración de los linfocitos B, mientras que el timo es esencial para la maduración de los linfocitos T, además de participar en la presentación de antígenos y la eliminación de linfocitos, esencial para la supervivencia [1][2]. Por otro lado, los **órganos linfáticos secundarios o periféricos**, como el **sistema linfático, ganglios linfáticos, bazo y tejido linfático asociado a las mucosas (MALT, del inglés *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)**,

desempeñan funciones especializadas en la regulación y generación de respuestas inmunitarias. Los ganglios linfáticos son sitios clave para la **interacción entre linfocitos T y B**, y la presentación de antígenos, generando **respuestas celulares y la secreción de anticuerpos**. El bazo, altamente vascularizado, juega un papel crucial en la eliminación de células sanguíneas envejecidas y en la respuesta inmunitaria contra antígenos sanguíneos. El MALT se especializa en la defensa contra patógenos que ingresan a través de superficies mucosas, siendo el sitio inicial de encuentro de células inmunitarias con antígenos externos [1][2]. En conjunto, estos órganos regulan el **desarrollo de linfocitos, participan en respuestas inmunitarias y detectan antígenos mediante la filtración de la linfa**.

- Estas células se originan mayormente a partir de células madre hematopoyéticas (**HSCs**, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) en la médula ósea. En términos generales, las células del SI se dividen en dos grandes categorías: **células mielocíticas o de linaje mieloide**, que incluyen fagocitos y la mayoría de las células dendríticas (**DC**, del inglés *Dendritic Cell*), y **células linfocíticas o linaje linfoide**, que abarcan todos los linfocitos. Las células del linaje **mieloide** están representadas por las células **dendríticas, macrófagos y mastocitos** que cumplen funciones clave como centinelas inmunológicos, detectando microbios y desencadenando respuestas inmunitarias [1][3]. Las células del linaje **linfoide** están representadas por las **células NK** (del inglés *Natural Killers*), del sistema inmune innato y por los **linfocitos B y T**, del sistema inmune adaptativo. Las células NK, junto a las células mieloides tienen un papel crucial en la respuesta inmune temprana contra células infectadas por virus y células tumorales. Los linfocitos T y B expresan receptores para antígenos distribuidos de manera clonal, siendo cada clon específico para un determinado antígeno. Los linfocitos B producen anticuerpos que actúan contra microorganismos extracelulares [2] mientras que los linfocitos T son mediadores de la inmunidad celular, especialmente contra microorganismos intracelulares [4].

## 1.2 LINFOCITOS T

Las células T, o **linfocitos T** son un componente esencial del SI que desempeñan un **papel central en la respuesta inmunológica** adaptativa (encargada de responder de manera específica a cada organismo exógeno como patógenos, células tumorales, etc.).

A continuación, se mencionan algunas de las características principales de las células T:

- **Reconocimiento de antígenos:** Las células T son capaces de reconocer específicamente fragmentos específicos de proteína llamados antígenos. Cada célula T tiene un receptor de antígeno único (TCR, del inglés *T Cell Receptor*) en su superficie que le permite reconocer un antígeno particular, presentado por los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*).
- **Expresión en superficie de los receptores de células T:** El reconocimiento de los antígenos por parte de las células T se realiza a través de los TCR. Son moléculas en la superficie de las células T que les permiten identificar y unirse a antígenos específicos presentados por las moléculas MHC. Estos receptores son únicos para cada célula T y son cruciales para la capacidad del SI para distinguir entre las células propias y extrañas [5].
- **Maduración en el timo y diversidad del TCR:** En el timo se produce la **selección tímica**, basada en la reordenación de los genes del TCR a través de procesos de recombinación entre los segmentos variables (V), de Diversidad (D) y de unión a la región constante (J), pudiendo generar una gran diversidad de genes TCR ( $>10^{16}$ ), cada uno de ellos expresados únicamente en una célula T. En el mismo timo, las células T que han completado con éxito la reordenación del TCR se someten a una selección clonal donde las células que reconocen antígenos propios son eliminadas, evitando así la autoinmunidad. Una vez eliminadas las células T autorreactivas, este proceso ha generado multitud de células T, cada una con un TCR diferente, permitiendo que el organismo pueda reconocer una amplia variedad de antígenos. Este proceso de generación de diversidad contribuye a la adaptabilidad del SI [5][6].
- **Diversidad de células T:** Un aspecto fundamental del funcionamiento de SI es la gran diversidad de respuesta de las células T, en base apoyado en su diversidad celular. Los linfocitos T se dividen en diferentes subtipos con funciones específicas: linfocitos cooperadores (TH1 y TH2, del inglés *T Helper 1 y 2*), cooperadores (TH17 y Treg) y citotóxicos (CTL, linfocito T citotóxico, del inglés, *cytotoxic lymphocyte T Cell*). Aunque se pueden establecer muchos tipos de células T, hay dos subtipos principales con funciones muy bien diferenciadas:
  - **Células T citotóxicas (CD8+):** Son los CTL, aquellos linfocitos responsables de la **destrucción directa de células infectadas** por virus y células cancerosas [2]. Estas células T son citotóxicas contra las células tumorales y las células del huésped infectadas. Expresan el correceptor **CD8** y destruyen células infectadas de manera específica para el antígeno, lo cual depende de la expresión de moléculas de **MHC de clase I** en las células presentadoras de antígeno (APCs, del inglés *Antigen Presenting Cells*). Los CTLs son capaces de matar a las células diana directamente induciendo la

apoptosis, pero sólo en la célula en cuestión; las células del tejido circundante no se ven afectadas.

Los linfocitos T CD8+ pueden clasificarse en subgrupos según su expresión de citocinas. La mayoría de los CTL CD8+ producen citocinas tipo 1 y se conocen como linfocitos **CTL1**. Los que producen citocinas tipo 2 se conocen como los **CTL2** y están asociados a funciones reguladoras. Finalmente, cuando estos linfocitos mantienen una respuesta continuada en el tiempo acaban virando su fenotipo a linfocitos T agotados o exhaustos (**T<sub>EX</sub>**), una nueva subpoblación de linfocitos que acaban perdiendo su función efectora y, finalmente, muriendo [7].

- **Células T cooperadoras (CD4+): Coordinan y regulan la respuesta inmunológica**, ayudando a otras células inmunitarias a combatir infecciones y desencadenando respuestas específicas. Las células TH son las principales reguladoras de las respuestas mediadas por células T y células B: ayudan a los subconjuntos de linfocitos B estimulados por antígenos a proliferar y diferenciarse hacia células productoras de anticuerpos. Expresan la molécula correceptora **CD4**, y reconocen antígenos exógenos en **MHC de clase II** en células B, macrófagos u otras APCs. Además, ayudan a los linfocitos T efectores en la inmunidad mediada por células [5]. Por otro lado, los **TH17** y los **Treg** están encargados de **regular o modular la respuesta inmunitaria**, evitando así una respuesta descontrolada del organismo [1][5].
- **Memoria Inmunológica**: Después de ser expuestas a un antígeno, algunas células T sobreviven a la muerte celular inducida por activación (**AICD**, por sus siglas en inglés de *Activation Induced Cell Death*) o a la retirada de IL-2 y se convierten en **células de memoria**. Estas células de memoria permanecen en el organismo durante períodos prolongados, lo que confiere **inmunidad a largo plazo** contra antígenos específicos. Las respuestas a esta segunda exposición y a las sucesivas, denominadas **respuestas inmunitarias secundarias**, suelen ser más rápidas, de mayor magnitud y más amplias que la primera respuesta inmunitaria a ese antígeno, y a menudo son cualitativamente diferentes [1][6].
- **Distribución en tejidos y órganos**: Después de su maduración en el timo, las células T circulan por la sangre y se distribuyen por todo el cuerpo, incluyendo ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados al intestino.

### 1.2.1 ESTADOS, DIFERENCIACIÓN Y FENOTIPO

Como se ha mencionado anteriormente, la **maduración y selección tímica de los linfocitos T en el timo** implica el escrutinio de aquellos timocitos T cuyos TCR muestran una afinidad adecuada por antígenos propios (proteínas propias del cuerpo) y, al mismo tiempo evitan una reacción excesiva frente a estos. Durante la maduración tímica, los linfocitos pasarán a ser células **T CD8+** (CTL) o **T CD4+** (TH y Treg) en función de si su TCR es capaz de reconocer antígenos presentados por **MHC-I** o **MHC-II** respectivamente. Este proceso conduce a la generación de linfocitos T Naïve (**T<sub>N</sub>**), células que aún no han experimentado ningún contacto con su antígeno específico. Después de la maduración en el timo, los linfocitos T<sub>N</sub> lo abandonan y circulan por la sangre y los tejidos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos y el bazo, a la espera de encontrar su antígeno específico. Cuando un linfocito T<sub>N</sub> encuentra un antígeno presentado por una APC a través de las moléculas MHC, se activa y se somete a una **proliferación clonal**, dando lugar a **células efectoras** (T<sub>EF</sub>) que participan en la respuesta inmunitaria [8].

En la **activación** y posterior diferenciación de los linfocitos T<sub>N</sub> intervienen tres tipos diferentes de señales, que serán desarrolladas en detalle más adelante. Las dos primeras son requeridas para su activación y la tercera modula y amplifica la respuesta en función del contexto donde se encuentren:

1. La **primera señal** proviene de la interacción del TCR con su antígeno en el contexto del complejo MHC-I (en células CD8+) o MHC-II (en células CD4+) en las APC. Esta interacción, inicia la activación de las células T, haciendo que las moléculas de CD4 y CD8 se unan también a las respectivas moléculas de MHC. Esta primera señal ocurre principalmente en los órganos linfoides secundarios [1][6].
2. **Segunda señal.** Para que las células T puedan responder a la amenaza, además de la señalización promovida por la interacción TCR-MHC-antígeno, se requiere una segunda señal de coestimulación. Estas señales de coestimulación se producen durante la interacción entre las APCs y las células T a través de diferentes moléculas con diferentes afinidades para unirse entre sí y que se agregan de manera ordenada alrededor del TCR-MHC-antígeno para formar la **sinapsis inmunológica**. Dos de las interacciones más potentes en el proceso de esta segunda señal son las de las moléculas CD28 y 4-1BB (presentes en las células T) con CD80/CD86 y 4-1BBL (presentes en las APCs)[1][6].
3. La **tercera señal** resulta crucial para la activación completa y eficiente de los linfocitos T. Durante el proceso de activación a través de la primera y segunda señal, así como después de dicha activación, las células T se encuentran con diferentes moléculas

(citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento) que van a modular la respuesta generada por dichas células T. Por ejemplo, de manera general, la presencia de IL2 es necesaria para la supervivencia y proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+, la IL-12 promueve la diferenciación a linfocitos T CD4+ hacia Th1, mientras que la presencia de IL4 las polariza hacia Th2 [1][6].

Como resultado de esta activación, se inicia la expresión de diversos genes que conducen a la proliferación del linfocito T<sub>N</sub> y su posterior diferenciación en subpoblaciones especializadas como son las células T citotóxicas conocidas como **células T Memoria (T<sub>M</sub>)** y las **células T Efectoras (T<sub>EF</sub>)**. Las células T<sub>EF</sub> tienen la capacidad de eliminar el antígeno en cuestión y, una vez han alcanzado su punto máximo de expansión y han cumplido su función en la eliminación del antígeno específico, la mayoría de estas células experimentan apoptosis o muerte celular programada. Por otro lado, las células T<sub>M</sub> sobreviven y proporcionan protección a largo plazo contra el mismo antígeno, generando así una inmunidad sostenida a lo largo del tiempo [4].

Existen, al menos, dos clases principales de linfocitos T de memoria: las **células T de memoria efectora (T<sub>EM</sub>, del inglés *T Effector Memory*)** y las **células T de memoria central (T<sub>CM</sub>, del inglés *T Central Memory*) (Figura 1)**. Estos subconjuntos difieren en algunas propiedades importantes. En primer lugar, en ausencia de antígeno específico, las células T<sub>EM</sub> parecen tener una vida más corta que las células T<sub>CM</sub>. En segundo lugar, después de una respuesta primaria, las diferencias en la expresión de receptores de *homing* entre estas poblaciones conducen a diferencias en su distribución en todo el cuerpo.

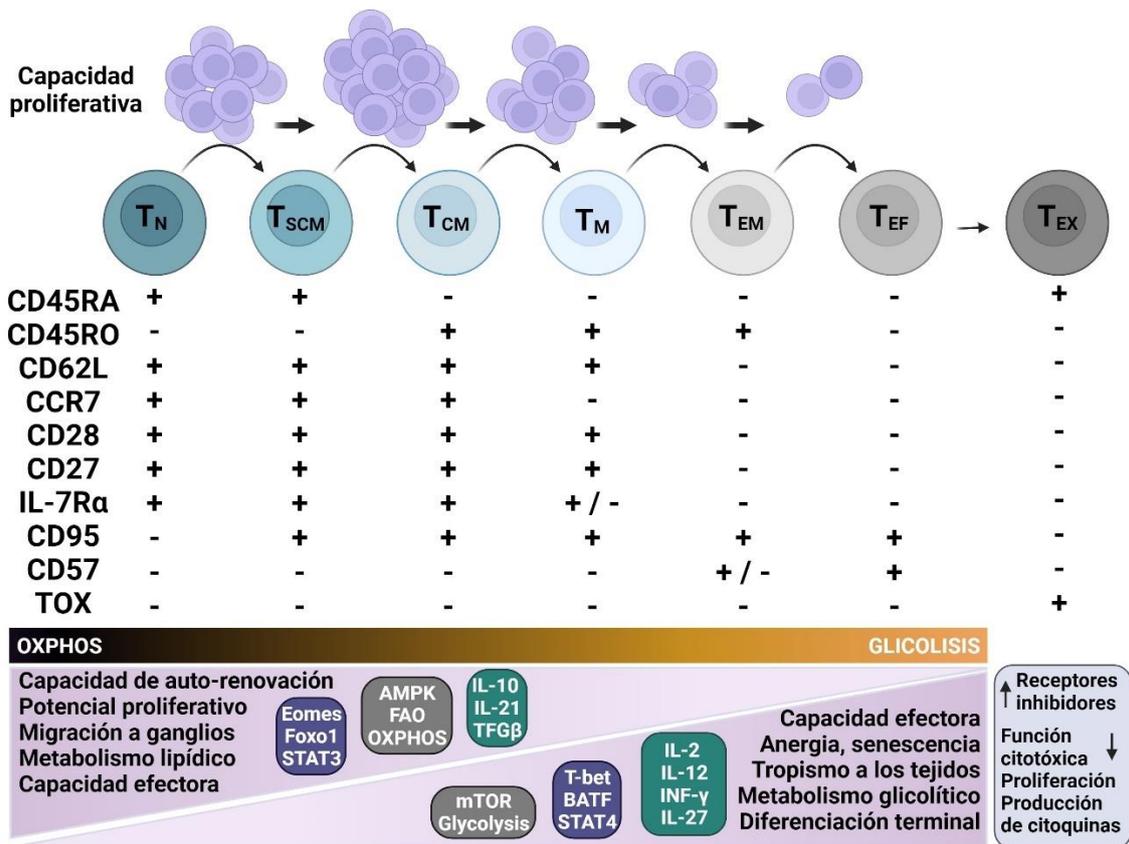
En particular, las células T<sub>CM</sub> expresan niveles altos de las moléculas de *homing* hacia los ganglios linfáticos, L-selectina (CD62L) y el receptor de quimiocinas tipo 7 (CCR7). En consecuencia, estas células tienden a migrar a través de los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides secundarios, manteniendo así un reservorio central de células de memoria a largo plazo. En contraste, las células T<sub>EM</sub> expresan niveles bajos de CD62L y CCR7, por lo que circulan principalmente a través de tejidos no linfoides donde es probable que se encuentren con su antígeno por segunda vez. Como resultado, las células T<sub>EM</sub> patrullan constantemente los tejidos periféricos y pueden migrar rápidamente hacia sitios de infección. Juntas, **las células T<sub>M</sub> aseguran la capacidad del huésped para montar una respuesta fuerte e inmediata ante una exposición posterior a un antígeno previamente encontrado** [6].

Tras una estimulación continuada del antígeno, los linfocitos acaban virando hacia una subpoblación exhausta o agotada ( $T_{EX}$ , expresando los marcadores CD45RA+ TOX+) sin capacidades proliferativas, líticas y cerca de la anergia celular [7].

De acuerdo con el modelo jerárquico de diferenciación de células T (**Figura 1**) tras la estimulación antigénica, las células  $T_N$  (CD45RA+CD45RO-CCR7+CD62L+CD27+CD28+) experimentan una serie de transformaciones que llevan a la formación de distintos subtipos celulares. En primer lugar, se diferencian en células  $T_{CM}$ , (CD45RA-CD45RO+CCR7+CD62L+CD27+CD28+CD95+) las cuales poseen una mayor capacidad de proliferación y de migración hacia los ganglios linfáticos, debido a la expresión de CD62L y CCR7. Estas células tienen una función efectora limitada caracterizada por la capacidad de secretar principalmente IL-2. Las células  $T_{CM}$  dan lugar a células  $T_{EM}$  (CD45RA-CD45RO+CCR7-CD62L-CD27-CD28-CD95) que además de producir IL-2 son capaces de secretar otras interleucinas efectoras. Además, tienen preferencia por migrar a los tejidos periféricos donde se diferencian en células efectoras terminales diferenciadas ( $T_{EMRA}$ , del inglés *T effector memory re-expressing* CD45RA, y expresan CD45RA+ CCR7- CD62L-).

En un estudio realizado por Gattinoni y cols. en 2011, se demostró la existencia de un subtipo de células T memoria con características similares a las células madre ( $T_{SCM}$ , CD45RA+CD45RO-CCR7+CD62L+CD27+CD28+), que posee un fenotipo superficial similar al de las células  $T_N$  con una capacidad proliferativa elevada, pero carecen de función efectora evidente. Este compartimento parece tener el potencial tanto para una diferenciación multipotente como para una autorrenovación a largo plazo [4][9]. Estudios de epigenética recientes evidencian que, en el caso de las células CD8+ T humanas, la diferenciación sigue el orden de  $T_N$ - $T_{SCM}$ - $T_{CM}$ - $T_{EM}$  [10][11].

Esta clasificación en los diferentes subtipos de células T no es del todo exacta, dado que existen evidencias que sugieren la capacidad de inter-conversión entre ellos en función del contexto [4].



**Figura 1. Esquema representativo de los estadios de diferenciación de los linfocitos T.**

La parte superior de la figura muestra la correlación entre cada subpoblación y su capacidad proliferativa. La parte central muestra los marcadores inmunofenotípicos característicos de cada subpoblación de linfocitos T en el modelo jerárquico. La parte inferior muestra los factores de transcripción (morado), características metabólicas (gris) y las citocinas secretadas (verde) característicos de cada estadio celular. Figura creada con BioRender.com.

### 1.2.2 CAPACIDAD LÍTICA

Una vez que las células CTL reconocen una célula alterada a través de la interacción TCR-MHC-antígeno, se forma la **sinapsis inmunológica** que da lugar a la activación efectora, promoviendo la **inducción de apoptosis** en células diana mediante tres mecanismos principales:

- 1- **Secreción de gránulos citotóxicos.** Tras la formación de la sinapsis inmunológica, se produce la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos desde las CTL a la célula diana. Entre el contenido de estos gránulos se encuentran la **perforina** y las **granzimas**. La perforina es una proteína que genera poros en la membrana, mientras que las granzimas son una familia de serina proteasas que ingresan al citosol y desencadenan una serie de eventos apoptóticos [5].
- 2- **Interacción entre Fas y FasL.** Fas es una proteína de membrana celular que pertenece a la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR) (también conocido como CD95, APO-1 o TNFRSF6) en la superficie de la célula diana y su ligando, **FasL**, presente

en la superficie de las células T citotóxicas. Esta interacción conduce a la activación de una cascada de caspasas en la célula diana, un fenómeno conocido como **AICD** [5][12].

- 3- Secreción de citocinas citotóxicas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (**TNF $\alpha$ - $\beta$** , del inglés *Tumoral Necrosis Factor  $\alpha/\beta$* ) y la linfotoxina (**LT**), que inducen la apoptosis en la célula diana al unirse a su receptor TNFR1. Además, las CTL producen interferón  $\gamma$  (**IFN $\gamma$** ), que estimula a las células B para generar anticuerpos facilitando la eliminación a través de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos **ADCC** (del inglés, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) o la **activación del complemento**. IFN $\gamma$  también aumenta la expresión de MHC-I en células cercanas, mejorando así la presentación de antígenos y volviendo las células diana más visibles para las células T citotóxicas[13].

### 1.3 MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS T

Las células T requieren de la integración de señales de una gran variedad de antígenos extraños con una maquinaria intracelular limitada, lo que ha desconcertado durante mucho tiempo a los inmunólogos. La unión del **TCR** recluta moléculas señalizadoras que desencadenan una **red interconectada de eventos de señalización** que incluyen la fosforilación de proteínas y flujos de calcio. La **fuerza** (afinidad), **cantidad** (número de antígenos) y **calidad** (interacciones con moléculas coestimuladoras) de esta interacción inician una **variedad diversa y dinámica de respuestas** que dependerán, en parte, del estado de la célula T. Como se acaba de comentar previamente, en las células **T<sub>N</sub>** el reconocimiento del antígeno estimula cambios metabólicos, transcripción, traducción y proliferación, así como su diferenciación hacia diferentes subtipos efectores y memoria. Estos efectos de la señalización se producen en el transcurso de horas o días. Sin embargo, en las células **T<sub>E</sub>**, la unión del TCR induce respuestas rápidas (segundos o minutos) como proliferación, supervivencia, producción de citocinas y, para los CTL, secreción de proteínas citotóxicas. Para entender esta complejidad, primero hay que entender la maquinaria involucrada en estas señalizaciones:

#### 1.3.1 COMPLEJO DEL TCR (PRIMERA SEÑAL)

El receptor de antígeno de los linfocitos T es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas transmembrana: **TCR  $\alpha$  y  $\beta$** , unidas covalentemente por un enlace disulfuro extracelular. Los linfocitos T que expresan este TCR se denominan linfocitos **T  $\alpha\beta$** . Existe otro tipo menos común de TCR formado por las cadenas  **$\gamma$  y  $\delta$** , y las células que los expresan se conocen como células **T  $\gamma\delta$** , siendo menos abundantes en la sangre, pero más prevalentes en superficies epiteliales como la piel e intestino [2][5].

Cada cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR consta de un dominio tipo inmunoglobulina (Ig) variable (V) N terminal, un dominio tipo Ig constante (C) y una región transmembrana hidrofóbica y una región citoplasmática corta. La porción extracelular del heterodímero  $\alpha\beta$  del TCR tiene una estructura similar al fragmento de unión al antígeno (Fab, del inglés *Fragment Antigen-Binding*) de una molécula de Ig. Las regiones V de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  contienen secuencias de aminoácidos variables, llamadas regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *Complementarity Determining Region*), que participan en el reconocimiento específico de los complejos péptido-MHC [2].

Además, el TCR tiene proteínas asociadas, como **CD3  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$** , junto con la **cadena  $\zeta$** . Son homólogas y forman parte del complejo del TCR. Estas proteínas contienen dominios similares a la Ig. La interacción entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR y las proteínas CD3 y  $\zeta$  se mantiene mediante enlaces disulfuro. Estos dominios citoplasmáticos de las proteínas **CD3 y  $\zeta$**  contienen motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (**ITAM**, del inglés *Tyrosine-Based Activation Motif*). Estos motivos son **fosforilados** durante la activación del TCR.

La cadena  $\zeta$ , expresada como un homodímero, también se asocia con receptores de señales en otros linfocitos, como el receptor para Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ RIII) de las células NK [2].

### 1.3.2 MOLECULAS CO-ESTIMULADORAS Y SU FUNCIÓN (SEGUNDA SEÑAL)

Las señales lanzadas por la interacción entre el TCR y el complejo MHC-antígeno son moduladas por la interacción entre las moléculas co-estimuladoras y sus receptores en las células APC. Estas moléculas fundamentales en las respuestas T pertenecen a dos familias diferentes:

- **Familia de receptores co-estimuladores CD28.** Los coestimuladores más definidos en los linfocitos T son B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se encuentran en las APC, y se unen al receptor CD28 en los linfocitos T. La molécula CD28 es el **principal receptor co-estimulador** encargado de transmitir señales adicionales para la activación de los linfocitos T. Otra molécula activadora de la familia CD28 es el coestimulador inducible (**ICOS**, por sus siglas en inglés *Inducible T-cell Costimulator*), que desempeña un papel crucial en el desarrollo de los linfocitos T cooperadores foliculares [1].
- **Familia de receptores co-estimuladores CD2/SLAM.** En linfocitos T humanos, CD2 actúa como molécula de adhesión entre células y como transductor de señales [1]. La molécula de activación de señalización linfocítica (**SLAM**, del inglés *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*), al igual que otros miembros de la familia CD2, es una proteína de membrana con dos dominios extracelulares de Ig y una cola citoplasmática larga. La cola citoplasmática de

SLAM interactúa con la proteína asociada a SLAM (SAP, del inglés *SLAM associated protein*) y forma un puente entre SLAM y FYN (una quinasa de la familia SRC que también se asocia físicamente con las proteínas CD3 en los linfocitos T). SLAM y otros miembros de la familia actúan como receptores coestimuladores en linfocitos T, células NK y algunos linfocitos B [1]. La asociación de CD2 con las moléculas de la familia SLAM proporciona señales coestimuladoras importantes durante la interacción entre las células del SI.

### 1.3.3 SINAPSIS INMUNOLÓGICA (SEÑAL 1 Y SEÑAL 2)

La diversidad estructural y funcional de los TCR permite a los linfocitos T participar en **respuestas inmunitarias específicas adaptativas**, reconociendo y respondiendo a una amplia variedad de antígenos presentados en diversas condiciones y tejidos del organismo [2].

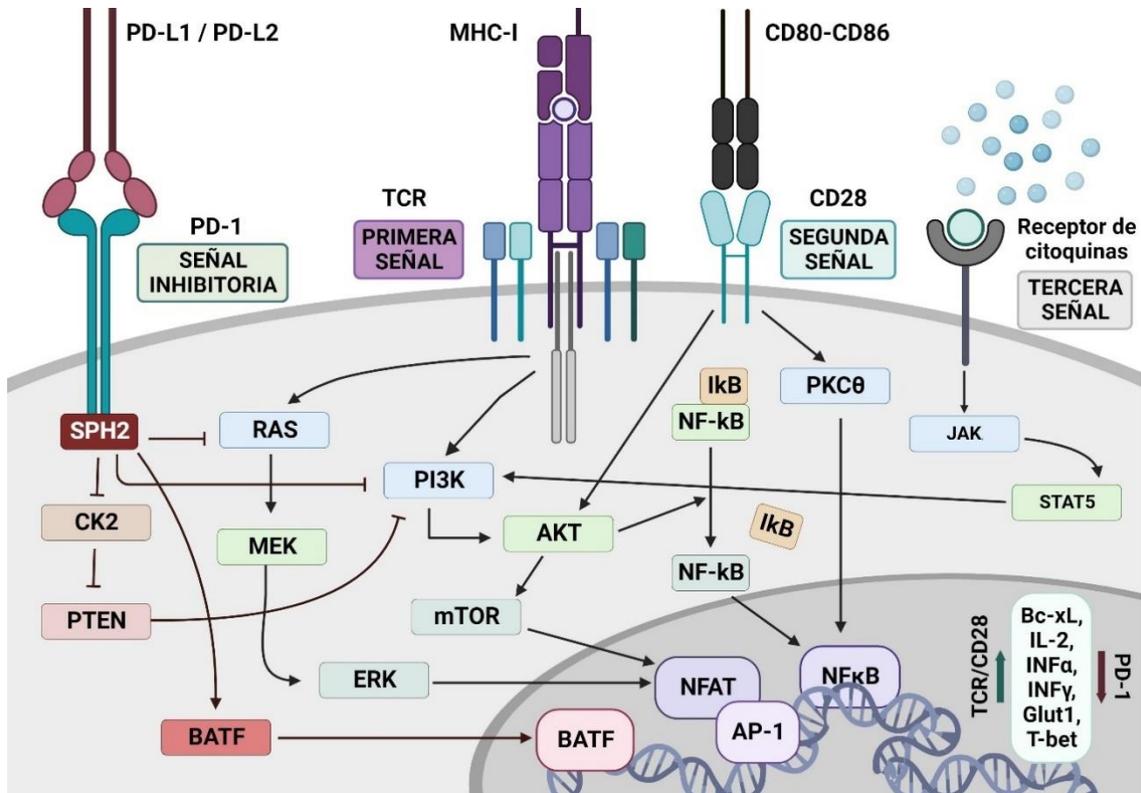
Cuando el complejo del TCR reconoce los péptidos presentados en el MHC de una APC, varias proteínas y moléculas de señalización se desplazan hacia la zona de contacto entre el linfocito T y la APC. Esta **región de contacto**, conocida como **sinapsis inmunitaria** o cúmulo de activación supramolecular (**SMAC**, *Central Supramolecular Activation Cluster*), se organiza en una estructura en forma de diana [1]. En el centro de la sinapsis (**c-SMAC**), se encuentran el complejo del TCR, correceptores como CD4 o CD8, y receptores co-estimuladores como CD28, junto con enzimas y proteínas adaptadoras. Las integrinas, que estabilizan la unión del linfocito T a la APC, se encuentran en la periferia de la sinapsis (**p-SMAC**). En conjunto, estas interacciones en la sinapsis inmunitaria aseguran una **respuesta coordinada y específica**, permitiendo que los linfocitos T reconozcan y respondan eficazmente a los antígenos presentados por las células del organismo [5].

### 1.3.4 PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T

Las **tres señales son necesarias** para la activación final de los linfocitos T (TCR-MHC-antígeno, correceptoras y citocinas) ya que utilizan rutas que, aun siendo diferentes, interactúan entre ellas a diferentes niveles (ver **Figura 2**). Todas ellas utilizan rutas de señalización que activan diferentes enzimas como las quinasas y las fosfatasas, reclutando moléculas adaptadoras y finalmente activando factores de transcripción. La **interacción compleja** de todas las señales activadas por la unión de 1) el TCR con el complejo MHC-antígeno, 2) los correceptores con sus ligandos y 3) las citocinas con sus receptores, da lugar, en cada caso, a diferentes cambios (transcripcional, metabólico y funcional) en la célula T para responder de la manera más adecuada a cada situación. Además, este conjunto de señales ha de ser capaz de preparar a las células T para

mantener la homeostasis. Es decir, las células T han de ser capaces de, según el entorno, atenuar su respuesta o seguir actuando de la manera más eficaz posible.

A continuación, se exponen las diferentes vías de señalización en las células T:



**Figura 2. Esquema representativo de las principales rutas de señalización en linfocitos T.**

Figura mostrando los receptores encargados de la primera, segunda y tercera señal para la **activación y diferenciación de los linfocitos T** además de la señalización intracelular que desencadena cada una.

La activación de células T comienza con la interacción del **TCR (primera señal)** con antígenos presentados por APC a través de MHC I o II en órganos linfoides secundarios. Se requiere una **segunda señal de coestimulación**, como la interacción de moléculas CD28 y 4-1BB en células T con CD80/CD86 y 4-1BBL en APC, para una respuesta efectiva. La **tercera señal** implica la modulación de la respuesta de las células T por medio de citoquinas clave como IL-2, IL-12 e IL-15. Estas moléculas juegan un papel esencial en la regulación de la activación completa y eficiente de las células T, influyendo en su diferenciación y función. La señalización intracelular desencadenada por estas citoquinas contribuye a respuestas inmunitarias específicas y coordinadas.

Además, la figura muestra el **bloqueo ejercido por un receptor inhibitorio (PD-1)** de las células T sobre su principal señalización intracelular. Figura creada con BioRender.com.

### 1.3.4.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PRIMERA SEÑAL (TCR-MHC-antígeno)

Todas las señalizaciones provenientes de esta ruta comienzan tras la interacción del **TCR con el MHC**, permitiendo el acercamiento de la quinasa **Ick** (unida a CD4 o CD8) a la proteína **CD3ζ**. La quinasa Ick fosforila entonces los dominios **ITAMs** presentes en CD3ζ, así como a **ZAP70** que a su vez fosforila **LAT**, comenzado así todo un proceso de activación en cadena, principalmente a través de la vía de la fosfolipasa C (PLC del inglés *Phospholipase C*) también denominada vía del

**calcio-NFAT** (factor nuclear de las células T activadas, del inglés *Nuclear Factor of Activated T-cells*).

Entonces, los complejos **NFAT/c-Jun/c-Fos** actúan aguas abajo del TCR y el receptor coestimulador CD28 para inducir la expresión de citocinas efectoras. c-Jun/c-Fos inducen la expresión de genes del ciclo celular mientras que los factores de transcripción de tipo ATF similar al factor de transcripción de leucina básica (**BATF**, del inglés *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor*) y el factor de respuesta a interferón 4 (**IRF4**, del inglés *Interferon Regulatory Factor 4*) forman complejos ternarios con cada una de las proteínas Jun, promoviendo así la accesibilidad de la cromatina.

#### 1.3.4.1.1 Vía del calcio-NFAT

El **NFAT** es un **factor de transcripción** necesario para la expresión de genes que codifican **IL-2, IL-4, TNF y otras citocinas**. Está presente en una forma inactiva con serinas fosforiladas en el citoplasma de los linfocitos T en reposo [14]. NFAT se activa por la **fosfatasa calcineurina** dependiente del calcio y la calmodulina, que defosforilan NFAT citoplasmático, con lo que descubre una señal de localización nuclear que permite al NFAT pasar al **núcleo**. Una vez en el núcleo, el NFAT se une a las regiones reguladoras de IL2 y de otros genes, habitualmente asociados a otros factores de transcripción, como el complejo proteico adaptador 1 (**AP1**, del inglés *Adaptor Protein Complex-1*).

AP1 es un factor de transcripción que se encuentra en muchos tipos celulares y se activa de forma específica en los linfocitos T mediante señales del TCR. El factor AP1 mejor caracterizado se compone de las proteínas **Fos** y **c-Jun**. La formación de AP1 activa implica habitualmente la síntesis de la proteína Fos y la fosforilación de la proteína c-Jun preexistente, ambas estimuladas por quinasas MAP, que son a su vez activadas por señales inducidas por el TCR. La AP1 se asocia físicamente a otros factores de transcripción en el núcleo y actúa mejor combinada con NFAT. De este modo, la activación de AP1 representa un punto de convergencia de varias vías de transmisión de señales iniciadas por el TCR [15].

#### 1.3.4.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA SEGUNDA SEÑAL (CO-RECEPTORES)

##### 1.3.4.2.1 Vía PI3K/AKT/mTOR

Aunque una de las enzimas cruciales activada por la interacción TCR-MHC es la fosfoinositol 3-quinasa (**PI3K**, del inglés *Phosphoinositide 3-Kinase*), es la suma de la primera y segunda señalización la que permite una activación adecuada de esta ruta. La PI3K es una quinasa de

lípidos que produce la fosforilación del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>, del inglés *Phosphatidylinositol Bisphosphate*) de la membrana, para generar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), necesario para activar la proteína quinasa **Akt** que a su vez activa múltiples vías cruciales para la supervivencia y la proliferación. Esta ruta CD28-PI3K-AKT-mTOR promueve la **proliferación y supervivencia** de las células T a través de la activación de elementos situados aguas abajo, tales como el factor nuclear- $\kappa$ B (**NF- $\kappa$ B**, del inglés *Nuclear Factor  $\kappa$ B*), **NFAT**, **Bcl-xL**, **mTOR** (diana de la rapamicina en células de mamífero), el transportador de glucosa tipo 1 (**GLUT1**, del inglés *Glucose Transporter 1*) entre otros [16].

Esta vía de señalización es también activada por la primera señal y están involucrados en los siguientes procesos:

- Promueve la supervivencia celular al inhibir la apoptosis.
- Estimula la proliferación celular al promover el ciclo celular y la síntesis de ADN. La **activación de mTOR**, en particular, es esencial para la regulación del crecimiento y la entrada en la fase S del ciclo celular [17].
- Regula el metabolismo celular. Esta vía influye en el metabolismo celular al estimular la captación de glucosa y promover **la glucólisis**. Esto es crucial para proporcionar la energía necesaria para las funciones celulares, especialmente en células T activadas durante la respuesta inmunitaria (ver más adelante) [16][18].

#### 1.3.4.2.2 NF $\kappa$ B

El **NF- $\kappa$ B** desempeña un papel crucial en la respuesta inmunológica, siendo activado por diversas señales. Se refiere a un grupo de **factores de transcripción** muy relacionados que se activan en respuesta a señales del TCR y son esenciales, por ejemplo, para la **síntesis de citocinas**. Desempeña un papel central en procesos biológicos como la inflamación, la activación linfocitaria o la supervivencia celular [1] además de gestionar el **desarrollo y la supervivencia de las células T** [19].

En un estado quiescente, los factores de transcripción de la familia NF- $\kappa$ B se mantienen en el citoplasma unidos a un inhibidor llamado I $\kappa$ B. Sin embargo, cuando la célula T se activa, **Akt** interviene en la **reubicación de NF- $\kappa$ B** al núcleo de la célula, donde NF- $\kappa$ B se une al promotor de genes específicos que responden a Akt, como TNF $\alpha$  o IL-6, lo que resulta en un aumento de su expresión [19].

### 1.3.4.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA TERCERA SEÑAL (CO-RECEPTORES)

#### 1.3.4.3.1 JAK/STAT

Las vías de transducción de señales **JAK-STAT** (Janus Quinasa, Factor de Transcripción Activador de la Transcripción, del inglés *Janus Kinase- Signal Transducer and Activator of Transcription*) son esenciales en la **respuesta celular a las citocinas**. Los eventos mediados aguas abajo por JAK/STAT varían e incluyen **hematopoyesis, salud inmunológica, reparación de tejidos, inflamación, apoptosis y adipogénesis** conectando receptores de citocinas de las familias tipo I y II con factores de transcripción. A día de hoy hay identificadas cuatro tipos de JAK (JAK1-3 y TYK2) y siete de STAT (STAT1-4, 5a, 5b y 6) [20].

Las enzimas JAK, inicialmente inactivas, se unen no covalentemente a los dominios citoplasmáticos de los receptores de citocinas tipo I y II. Cuando dos receptores de membrana se aproximan debido a la unión de una citocina, las JAK asociadas se activan y fosforilan tirosinas en los dominios citoplasmáticos de los receptores agrupados. Algunas de estas fosfotirosinas son reconocidas por los dominios **SH2** de proteínas STAT citosólicas, las cuales se unen a ellas. Las proteínas STAT, ahora activadas, se acercan a las JAK y son fosforiladas por estas quinasas asociadas al receptor. Los dímeros STAT resultantes migran al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de ADN en regiones promotoras de genes que responden a citocinas, **activando así la transcripción génica** [20] o a factores de transcripción maestros como **T-bet, GATA-3 y FoxP3** [21].

#### 1.3.4.3.2 T-box/Eomes

Los factores de transcripción de la familia **T-box**, T-bet (T-box expresado en células T) y **Eomes** (Eomesodermina), se han relacionado con reguladores de la diferenciación y función de las células T CD8+ [22]. Durante las etapas tempranas de la activación de las células T CD8+, T-bet y Eomes cooperan para promover la formación de linfocitos citotóxicos al inducir la **expresión de las perforinas y granzima B** [22]. En el contexto de las células T de memoria CD8, tanto T-bet como Eomes mantienen los **fenotipos de memoria** al estabilizar la expresión del receptor IL2R $\beta$ , promoviendo así la señalización de varias citocinas como IL-15 y la proliferación continua de las células de memoria [23]. T-bet y Eomes tienen **roles cooperativos** y redundantes en las células T CD8+, pero también tienen influencias únicas en la función de estas células [24].

La función de Eomes se estudió por primera vez en las células T CD8+, donde se demostró que promovía la expresión de la subunidad IL2R $\beta$  (o CD122) del receptor de IL-15, junto con T-bet [23].

### 1.3.5 CAMBIOS METABÓLICOS EN LAS CÉLULAS T

El metabolismo de las células inmunitarias experimenta una gran plasticidad y destaca que el cumplimiento adecuado de las funciones inmunológicas requiere un ajuste fino entre el metabolismo celular y mitocondrial, de manera dependiente del contexto. La regulación metabólica de las células del SI está estrictamente regulada por varias vías, incluyendo la señalización de **AMPK** (del inglés *AMP-activated Protein Kinase*), **PI3K/Akt** y **NF-κB** (Figura 3), y se ve afectada por múltiples factores, incluyendo las interacciones célula a célula, las citocinas liberadas, la disponibilidad de nutrientes y las biomoléculas activas [25]. Por tanto, las células T experimentan cambios metabólicos al activarse de manera continuada en el TME [26]. En este caso, las células T pueden volverse **agotadas o exhaustas**, lo cual se caracteriza por la pérdida de funciones efectoras, expresión elevada y sostenida de receptores inhibidores (**IR**) y perfiles epigenéticos y transcripcionales alterados [27]. Cada una de estas fases se caracteriza por **demandas metabólicas únicas** para la energía, biosíntesis de macromoléculas y redox, acompañadas de cambios dinámicos en el metabolismo celular, también conocido como reprogramación metabólica [28], que afecta el desarrollo de enfermedades autoinmunes al **regular la diferenciación y función de las células T** [29].

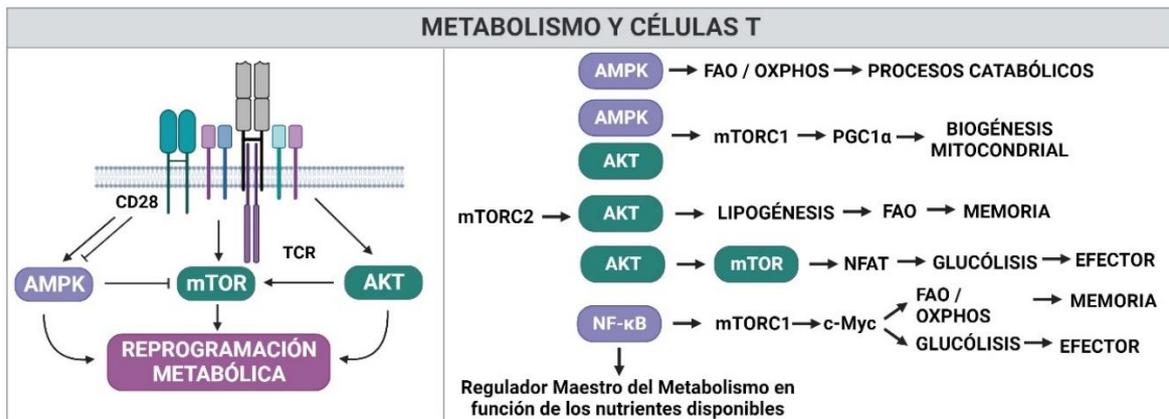
En reposo, las células T tienen demandas de energía más bajas y dependen principalmente de la **fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *Oxidative Phosphorylation*)** para obtener **energía** independiente de la glucólisis. Sin embargo, la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células T efectoras requieren de la **glucólisis** [29][30]. Los linfocitos también pueden utilizar ácidos grasos como fuente de energía como ocurre en el caso de la **β-oxidación de ácidos grasos (FAO, por sus siglas en inglés *Fatty Acids Oxidation*)** está vinculado a la diferenciación de las células T<sub>M</sub> [30]. La plasticidad metabólica y la regulación del agotamiento de las células T han sido ampliamente revisadas por Li et al. [31]. La **FAO** y la **OXPHOS** son las principales fuentes de energía para las células T con agotamiento prematuro (T<sub>PEX</sub>) o memoria, mientras que las células T<sub>EX</sub> terminalmente dependen del metabolismo glucolítico, pero tienen una menor captación de glucosa y una incapacidad para utilizar eficazmente la OXPHOS para proporcionar energía [30][31].

El metabolismo inmunológico comparte una vía metabólica común, **crea ATP** a través del ciclo del ácido tricarbóxico (**TCA, del inglés *Tricarboxylic Acid Cycle***) o ciclo de Krebs, dentro de las mitocondrias [32] para obtener la energía requerida por la célula.

Tres componentes importantes del metabolismo celular son: (1) la tasa de acidificación extracelular (**ECAR**, del inglés *Extracellular Acidification Rate*) como **indicador de la glucólisis** y la producción de acetato (energía glucolítica), (2) la tasa de consumo de oxígeno (**OCR**, del inglés *Oxygen Consumption Rate*) y **OXPHOS**, quien se encarga de generar ATP, como **indicadores de la respiración mitocondrial** (energía aeróbica) y (3) la capacidad respiratoria disponible (**SRC**, del inglés *Spare Respiratory Capacity*), que se refiere a la **capacidad de generación de energía de reserva** disponible en las mitocondrias más allá del estado basal. Es **esencial para la longevidad o supervivencia a largo plazo y la función óptima** de las células T [33].

En función a estos conceptos previamente descritos, tanto *in vivo* como *in vitro*, las células T activadas muestran niveles más altos de ECA y de OCR en comparación con las células T<sub>N</sub> [34], lo que sugiere que las células T activadas utilizan simultáneamente la glucólisis aeróbica y la OXPHOS [35].

Tras la activación, las células T<sub>N</sub> la salida de la quiescencia se ve marcada por dos "características distintivas": la remodelación intracelular del **metabolismo anabólico** (glucólisis, glutaminólisis, biosíntesis de lípidos y metabolismo del mevalonato) y la **función mitocondrial** (biogénesis mitocondrial, OXPHOS y metabolismo del carbono) [36].



**Figura 3. Relación entre metabolismo y rutas de señalización de los linfocitos T.**

La parte izquierda muestra la **relación entre** la primera (**TCR**) y segunda señal (**CD28**) con la **reprogramación metabólica** de las células T debido a la señalización a través de **mTOR, AMPK y AKT**. La parte derecha muestra la **correlación directa entre la primera señal (verde) o la segunda señal (morado) con el metabolismo** y fenotipo celular. Figura creada con BioRender.com.

### 1.3.5.1 RESPIRACIÓN INTRACELULAR

La afinidad, duración e intensidad de las señales del TCR determinan los programas metabólicos y funcionales de las células T. La respiración intracelular promueve la **activación de las células T**, la **especialización funcional** y la **proliferación clonal** en lugar de la supervivencia [36].

Cuando el conjunto de las señales que llegan a las células T alcanza un umbral específico, se produce un cambio metabólico hacia el **catabolismo de la glucosa** impulsando a las células T hacia un estado efector diferenciado y, por ende, terminal [29]. En dirección contraria, la inhibición de la glucólisis puede limitar la diferenciación terminal, promoviendo longevidad y un fenotipo memoria. A continuación, se describen las principales rutas de la respiración intracelular (**Figura 4**, izquierda):

El metabolismo de la glucosa se puede dividir en [29]:

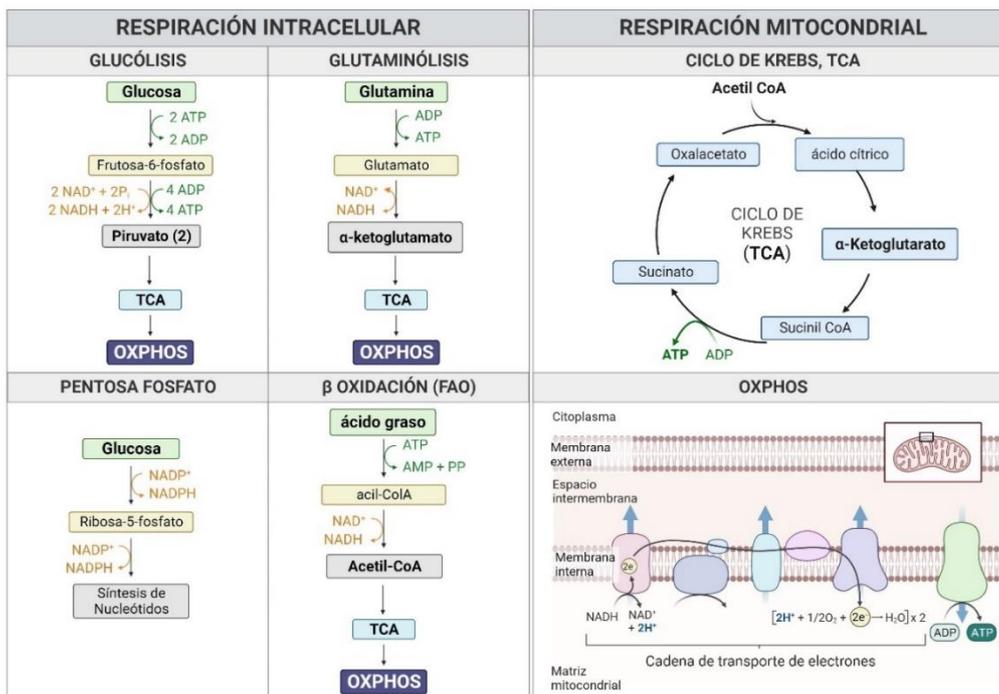
- **Oxidación aeróbica.** La glucosa se oxida a **piruvato** en **presencia de oxígeno** suficiente. El piruvato se oxida a **acetil-CoA**, que se oxida aún más a agua y dióxido de carbono a través del **TCA** en las mitocondrias. La piruvato deshidrogenasa (PDH, del inglés *Pyruvate Dehydrogenase*) descarboxila irreversiblemente el piruvato, produciendo acetil-CoA. Éste es un punto de control crítico entre la glucólisis y el metabolismo oxidativo en las células T (**OXPHOS**). El acetil-CoA ingresa al ciclo del TCA, se oxida, pierde electrones creando un gradiente químico que impulsa la producción de **ATP**, un proceso llamado OXPHOS [29].
- **Oxidación anaeróbica.** En ausencia de oxígeno, el piruvato se cataliza mediante la lactato deshidrogenasa para producir **lactato** y 2 moles de **ATP**. El bloqueo de la captación de glucosa o la inhibición de secreción de lactato puede inhibir las funciones efectoras de las células T.
- **La vía de la pentosa fosfato (PPP)** es una ruta metabólica que se ramifica desde la glucosa-6-fosfato para generar ácidos nucleicos y NADPH, para la **producción de ácidos grasos, nucleótidos y aminoácidos no esenciales**.

La adaptación metabólica primaria de una **célula T activada** se traduce en un **aumento en el metabolismo de la glucosa**. Aunque la estimulación del TCR (primera señal) es necesaria, la señalización mediada por CD28 (segunda señal) es el regulador principal de la expresión de GLUT1 [18]. En células T activadas, al igual que en otros tipos celulares, el eje de señalización PI3K-AKT es necesario para aumentar la expresión de GLUT 1 y la captación de glucosa [18].

La **glutamina** es necesaria para la diferenciación **efectora** de las células T CD8 y regula la activación de las células T a través de varios mecanismos. Genera glutatión (**GSH**, del inglés *Glutathione*), crucial para alimentar el ciclo TCA mitocondrial y, por ende, la OXPHOS. El GSH neutraliza las especies reactivas de oxígeno (**ROS**, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y es esencial para la localización nuclear de NFAT y la proliferación de células T [36]. Si la **glutaminólisis** se inhibe, la proliferación celular y el fenotipo efector de células T se verá

afectado. La glutamina también activa **mTORC1** y, por tanto, la inducción de la actividad de Myc, promoviendo el metabolismo de la glucosa y la glutamina en las células T y la subsiguiente proliferación celular [36]. Por tanto, esta parte metabólica de la glutamina es importante porque, aunque las ROS mitocondriales son importantes y respaldan el metabolismo durante la activación de las células T a través de la señalización NFAT [37], niveles altos de ROS perjudican la actividad de mTOR y NFAT, lo que resulta en la disminución de c-Myc, afectando así el flujo glucolítico [37].

Por otro lado, la biosíntesis de lípidos es un proceso clave para la respiración mitocondrial por lo que las células T pueden utilizar ácidos grasos como fuente de **energía** para llevar a cabo a la vía **FAO**. Esta característica está vinculada a la **diferenciación de las células T memoria** [30]. La **β-oxidación** o FAO, es el proceso bioquímico que procesa los ácidos grasos hasta acetil-CoA. Gracias a este proceso se favorece el ciclo de Krebs o **TCA**. Además, la FAO es una vía importante para la **supervivencia** en células sometidas a estrés metabólico, y las células T reguladoras [38].



**Figura 4. Esquema representativo de la respiración celular y mitocondrial.**

Rutas características de la **respiración celular** (izquierda), **glucólisis** (Proceso catabólico que convierte la glucosa en piruvato, generando ATP y NADH en el citosol), **glutaminólisis** (Descomposición de la glutamina para obtener intermediarios metabólicos y generación de energía), **ruta de la pentosa fosfato** (Provee precursores para la síntesis de nucleótidos y antioxidantes, además de generar NADPH) y **β-oxidación** o **FAO** (Descomposición de ácidos grasos en la matriz mitocondrial, generando acetil-CoA y NADH).

Rutas principales de la **respiración mitocondrial** (derecha), el ciclo del ácido tricarboxílico (**TCA**, Ciclo que completa la oxidación de acetil-CoA, generando NADH y FADH<sub>2</sub>, y produciendo moléculas de ATP) y la cadena de transporte de electrones (**OXPHOS**, Serie de complejos proteicos en la membrana mitocondrial interna que utilizan electrones de NADH y FADH<sub>2</sub> para generar ATP a través de la fosforilación oxidativa). Figura creada con BioRender.com.

### 1.3.5.2 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

La **biogénesis mitocondrial**, la **OXPHOS** y la **dinámica mitocondrial** son **reguladores importantes** de las respuestas de las células T ya que los intermediarios glucolíticos y glutaminolíticos ingresan al **TCA** en las mitocondrias [36], cuyos metabolitos regulan la OXPHOS, la biosíntesis mitocondrial y la señalización intracelular (**Figura 4**, derecha). La OXPHOS regula la supervivencia y proliferación además de inducir células T efectoras CD4+ y CD8+ y regular su función [36][39].

Cuando están en reposo, las células T dependen de la **OXPHOS** y la **FAO** para reducir la producción de metabolitos tóxicos que podrían dañar la función celular [40]. Después de la activación de las células T, la glucólisis aumenta y continúa produciendo el ATP necesario para la actividad de las células T a través de la respiración aeróbica. Al mismo tiempo, se induce una síntesis metabólica dependiente de acetil-CoA para llevar a cabo la TCA, lo que es esencial para promover la activación de las células T [18], y satisfacer las necesidades de proliferación rápida. Durante la activación de las células T, la respiración mitocondrial también conduce a la producción de **ROS** [18], que estimularán la producción de factores de transcripción cruciales como **NFAT** para la activación temprana de las células T. Mecánicamente, las **señales coestimuladoras** del TCR conducen a la fusión de las membranas interna y externa de las mitocondrias en las células T, lo que mejora la **OXPHOS** potencialmente al impulsar un ensamblaje más eficiente de la cadena de transporte de electrones [36].

### 1.3.5.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LOS ESTADOS DE ACTIVACIÓN EN CÉLULAS T

Una **regulación fina del metabolismo** de las células T es esencial para su **desarrollo, diferenciación y función efectora**. La señalización de mTOR desempeña un papel central en la integración de señales metabólicas y ambientales para orquestar respuestas inmunológicas efectivas. Según el estadio de diferenciación, las células T tienen diferentes características metabólicas.

- **CÉLULAS T<sub>N</sub>** (**Figura 5**, izquierda). Estas células permanecen en un estado quiescente y por tanto, con **demandas metabólicas bajas**. Utilizan predominantemente la vía **OXPHOS** [37], alimentada por pequeñas cantidades de glucosa debido al **flujo basal de glucólisis**, aminoácidos y ácidos grasos, para generar ATP [36][41]. El estado metabólico quiescente de las células T<sub>N</sub> no es una configuración predeterminada, sino que se mantiene activamente, requiriendo **señales tónicas a través del TCR**, IL-7R y el receptor 1 de la esfingosina 1-fosfato (S1P1R, del inglés *Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1*) [41]. De esta manera, preservan la

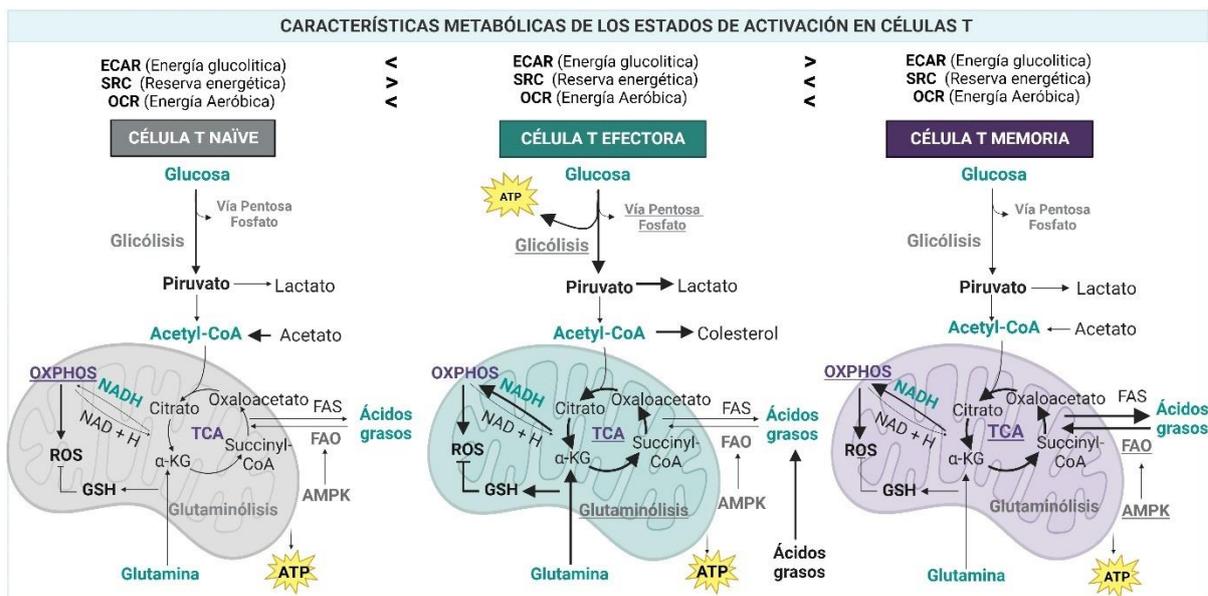
expresión de GLUT1 y aumentan el catabolismo de glucosa y aminoácidos. Muestran una baja actividad intrínseca de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR [37][42][43] y los subsiguientes niveles disminuidos de **ROS**.

- **CÉLULAS T EFECTORAS (T<sub>E</sub>) (Figura 5, centro)**. Su activación se acompaña de un metabolismo más dinámico, reprocesado para compensar los mayores requisitos de nutrientes. Se involucran rápidamente en múltiples vías metabólicas para respaldar su crecimiento, proliferación y función efectora. La inducción de la expresión de citocinas y la función efectora en las células T<sub>E</sub> es un proceso dependiente de la **glucosa**, por lo que las principales vías son: la **glucólisis aeróbica**, la **vía de la pentosa fosfato (PPP)**, la **glutaminólisis** y la **biogénesis mitocondrial** que facilitan la **OXPHOS** [37]. Por tanto, estas células activadas experimentan un **aumento en el flujo glucolítico** mediante la expresión mejorada de GLUT1, por lo que se vuelven más susceptibles a la privación de glucosa [44] y de ciertas enzimas metabólicas siguiendo señales del TCR y coestimulación de manera dependiente de **mTORC1** [45]. A diferencia de las células T<sub>N</sub>, el aumento de la captación de glucosa en las células T<sub>E</sub> se convierte principalmente en **lactato** o se asigna para la síntesis de intermediarios o macromoléculas, aunque a expensas de una ganancia neta baja de ATP [28]. Además, se encarga del mantenimiento de un entorno redox celular favorable [33]. Las enzimas de la glucólisis **GAPDH** y **LDHA** impactan en la expresión de IFN- $\gamma$  mediante mecanismos postranscripcionales y epigenéticos [41][44].
- **CÉLULAS T DE MEMORIA (T<sub>M</sub>) (Figura 5, derecha)**. Se han caracterizado tres subconjuntos distintos de células T de memoria según su fenotipo, patrón de migración y propiedades funcionales: **T<sub>CM</sub>**, **T<sub>EM</sub>** y **T<sub>SCM</sub>**. Estudios anteriores han establecido que los subconjuntos menos diferenciados de T<sub>CM</sub> y T<sub>SCM</sub> muestran una mejor expansión, supervivencia, persistencia y, por lo tanto, una actividad antitumoral elevada. Comprender las características y comportamientos metabólicos específicos de estos subconjuntos es otro punto crucial para optimizar la terapia con células CAR-T y mejorar los resultados clínicos.
  - Las células **T<sub>CM</sub>** cambian de la glucólisis a la **FAO** y la **OXPHOS**, por lo que presentan una **mayor SRC**, promoviendo supervivencia a largo plazo. El coactivador 1- $\alpha$  del receptor y activado por proliferadores de peroxisomas (**PGC-1 $\alpha$** , del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1 Alpha*) es un regulador clave de la biogénesis mitocondrial y modula la **OXPHOS** y la **FAO** [46].
  - Las células **T<sub>EM</sub>** utilizan la **OXPHOS** junto con la **glucólisis** para generar energía, mostrando una **ECAR** más alta, menos masa mitocondrial con una **SRC más baja**

y una tasa basal reducida de respiración celular [47]. La glucólisis juega un papel importante en proporcionar carbono para generar citrato en las mitocondrias y la posterior producción de IFN- $\gamma$  [41]

- Las células  $T_{SCM}$  son principalmente respaldadas por la **FAO** y se inclinan hacia el metabolismo de **OXPHOS** tras la estimulación del antígeno, por lo que muestran una **gran capacidad respiratoria mitocondrial** [37]. Prefieren la OXPHOS a la glucólisis sobre todos los demás subconjuntos de células T y poseen una **OCR aumentada**, un contenido de ATP y relación NADH/NAD mayores [48].

Las células  $T_N$  y, en menor medida, las células  $T_{SCM}$  retienen un reservorio sustancial de **GSH** para mantener un **estado REDOX favorable** [49]. Las células de memoria realizan la  **fusión mitocondrial** para respaldar la OXPHOS, mientras que las células efectoras mantienen tramos de fisión mitocondrial para promover la glucólisis aeróbica. Además, las células de memoria utilizan la **glucosa extracelular** para la síntesis endógena de ácidos grasos, en lugar de utilizar ácidos grasos extracelulares para alimentar la FAO [37].



**Figura 5. Características metabólicas de las diferentes subpoblaciones de los linfocitos T.** Preferencia energética: glicolítica (ECAR), aeróbica (OCR) y la capacidad respiratoria disponible (SRC) de cada subpoblación fenotípica de linfocitos T se muestra en la parte superior. La parte inferior muestra las rutas que se llevan a cabo de manera preferencial en cada subpoblación celular, subrayada y con las rutas más gruesas. Figura creada con BioRender.com.

### 1.3.5.4 INTERACCIÓN INMUNOMETABÓLICA EN EL CÁNCER

Un microambiente tumoral (**TME**, del inglés *Tumoral Microenvironment*) metabólicamente hostil a menudo conduce a la disfunción de las células T infiltradas, que parece ser el obstáculo más prominente en la terapia con células CAR-T contra tumores. Comprender este control metabólico

permite mejorar la capacidad para modular la eficacia y persistencia de las células CAR-T, lo que resultaría en beneficios clínicos para pacientes con diversos tipos de cáncer [37]. En el TME, la **competencia por los nutrientes, las condiciones físicas** y la existencia de **moléculas bioactivas** crea un entorno **inmunosupresor**. Esto induce la diferenciación de células reguladoras, **reduciéndose la inmunovigilancia y promoviendo la progresión tumoral** [50][51].

Es importante señalar que el **agotamiento** es un proceso dinámico en el que las células T experimentan varias fases y **cambios metabólicos** reflejados en una pérdida progresiva de sus funciones efectoras [31][52]. Por tanto, el TME altera el metabolismo de las células T efectoras CD4+ y CD8+, cruciales para la inmunovigilancia, induciendo la expresión de diferentes **puntos de control inmunológicos** como el receptor asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) (receptor asociado a CTL), **el receptor proteína de muerte celular programada 1 (PD-1**, del inglés *Programmed Death- 1*) y sus ligandos **B7-1/B7-2 y PD-L1/PD-L2**, afectando así en su función efectora. Debido a una activación celular persistente, la señalización sostenida de Akt y la expresión de PD-1 y CTLA-4 **en los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs**, del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) [53][54] **son capaces de disminuir el flujo glucolítico** inhibiendo la glucólisis y **alterando la homeostasis mitocondrial**, atenuando la actividad de las células T efectoras [37]. Se ha observado que la expresión de **PD-L1** también activa la **señalización de Akt/mTOR** en las **células cancerosas** [55], impulsando así la glucólisis tumoral con la subsiguiente reducción de la glucosa ambiental disponible. Además, debido a la alta tasa de glucólisis de las células cancerosas, secretan grandes cantidades de **lactato**, lo que puede afectar a las funciones de las células T, ya que niveles elevados de ácido láctico disminuyen la actividad del factor de transcripción NFAT, con una subsiguiente disminución en la producción de IFN- $\gamma$ .

La disponibilidad y competencia de **aminoácidos** en el TME también afectan las funciones de las células T. Como ha sido descrito, la glutamina puede respaldar a las células T efectoras mediante la activación de la señalización de AMPK y el soporte de la OXPHOS bajo limitación de glucosa [25].

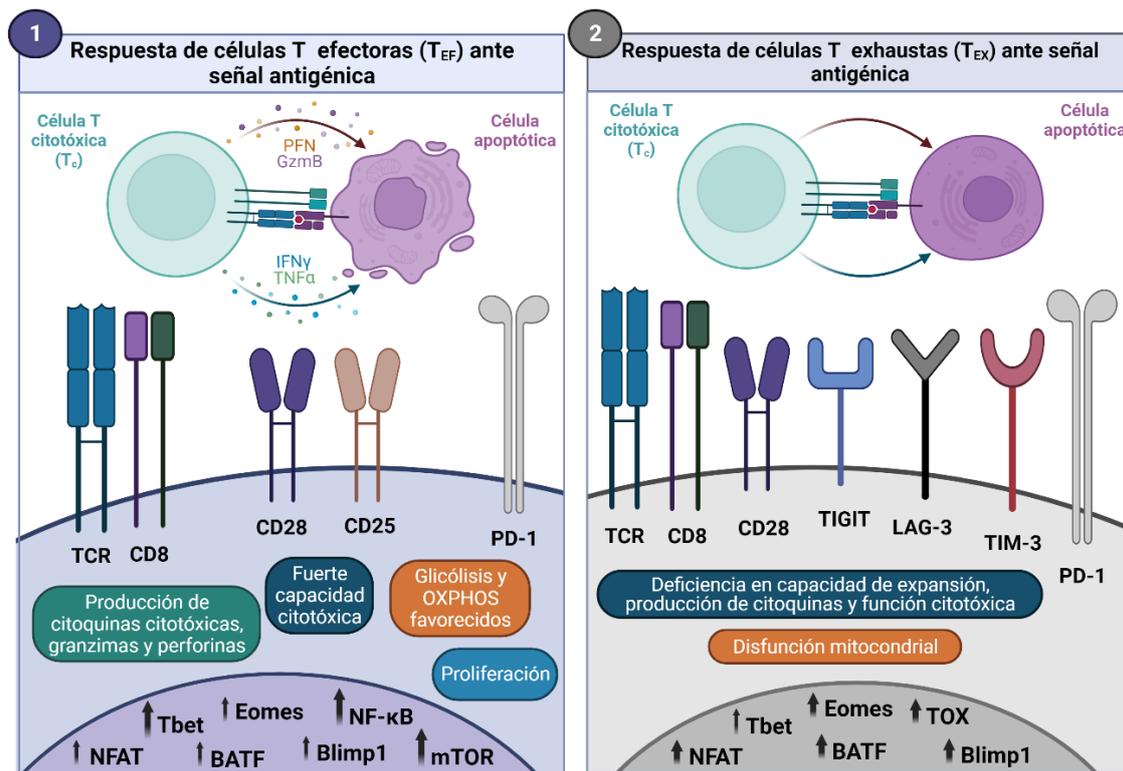
#### 1.4 DISFUNCIÓN Y AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T

El agotamiento de las células T<sub>E</sub> (**Figura 6**) se caracteriza por la **pérdida de funciones efectoras como la capacidad de proliferación, citotoxicidad**, alteraciones en las moléculas metabólicas y de transcripción, así como el **incremento en los puntos de control inmunológico (Figura 7)** [56].

Diversos factores han sido identificados como contribuyentes al proceso de agotamiento de las células T, los cuales pueden ser clasificados en dos categorías:

(a) los **factores intrínsecos**, relacionados con factores de transcripción, epigenéticos y metabólicos.

(b) los **factores extrínsecos**, incluyen interacciones extracelulares, la influencia de citocinas inmunosupresoras secretadas por el TME la propia matriz extracelular del TME [57].



**Figura 6. Esquema representativo del agotamiento de los linfocitos T.**

La parte **izquierda** representa las características de los **linfocitos T activados, con capacidad lítica**. Expresan en sus membranas PD-1 y CD25 como **marcadores de activación** (entre otros) y son capaces de secretar citocinas citotóxicas. Tienen capacidad proliferativa y citotóxica además de un metabolismo glucolítico.

La parte **derecha** de la figura representa las características de los **linfocitos T agotados, sin capacidad lítica**. Estos T<sub>EX</sub> expresan en su membrana receptores inhibidores (RI) como PD-1, TIM-3, LAG-3 o CTLA-4, inhibiendo la producción de citocinas citotóxicas y dando lugar a una disfunción mitocondrial, por lo que la capacidad citotóxica y proliferativa de estas células se ve comprometida. Figura creada con BioRender.com.

### 1.4.1 AGOTAMIENTO Y MARCADORES

El término "**agotamiento**" de células T, entre otras cosas, viene determinado por un aumento en la expresión de **receptores inhibidores (RI)** [58][59]. Entre estos RI se encuentran **TIM-3** o inmunoglobulina y dominio de mucina 3 en células T (del inglés *T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-Containing Protein 3*), **LAG-3** o gen 3 de activación linfocitaria (del inglés *Lymphocyte-*

*Activation Gene 3*), **PD-1**, **CTLA-4** y **TIGIT** (inmunorreceptor con un dominio Ig y un dominio ITIM, del inglés *T cell immunoglobulin and ITIM Domain*) [7][60](**Figura 6**).

Este término tiene sus raíces en el significativo deterioro de las respuestas de las células T inicialmente documentado en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se planteó la hipótesis de que la persistencia del virus se asociaba con la disminución de la funcionalidad observada en estos subconjuntos de células T [30].

Diferentes estudios indican que el programa epigenético y de transcripción central que impulsa el agotamiento de las células T CD8+ en infecciones crónicas y cáncer, tiene como principales desencadenantes factores como **la estimulación prolongada del TCR** y/o **la exposición a citocinas supresoras y a los subproductos metabólicos inmunosupresores** mediados por tumores. Muchos de estos factores se encuentran predominantemente en el **TME** [27] por lo que, cualquier estrategia de inmunoterapia tumoral, tendrá que hacer frente a este fenómeno para lograr beneficios clínicos [30].

El agotamiento de las células T da lugar a dos eventos fundamentales: 1) la inducción continua de los factores de transcripción **IRF4**, **BATF** y **NFAT** y 2) la expresión continua de **PD-1** y otros **RI**. La unión de estos RIs a sus ligandos conduce a una pérdida gradual de **c-Jun/AP-1**, lo que deja a NFAT sin pareja e induce genes alternativos como son los factores de transcripción **TOX** (del inglés *thymocyte selection-associated HMG box*) y el receptor nuclear de la subfamilia 4A (**NR4A**, del inglés *Nuclear Receptor Subfamily 4A*), perdiendo así las capacidades proliferativas y de secretar citocinas proinflamatorias.

En secuencia, TOX y NR4A promueven cambios en la accesibilidad de la cromatina en los potenciadores y promotores de genes que actúan en la red del **agotamiento**, favoreciendo su accesibilidad. Paralelamente, el aumento continuo de la expresión de BATF y IRF4, en ausencia de c-Jun/AP-1, conduce a un escenario de colaboración diferente, donde NFAT/BATF/IRF4 forman complejos en sitios ahora accesibles, relacionados con el **agotamiento** [7][60][61].

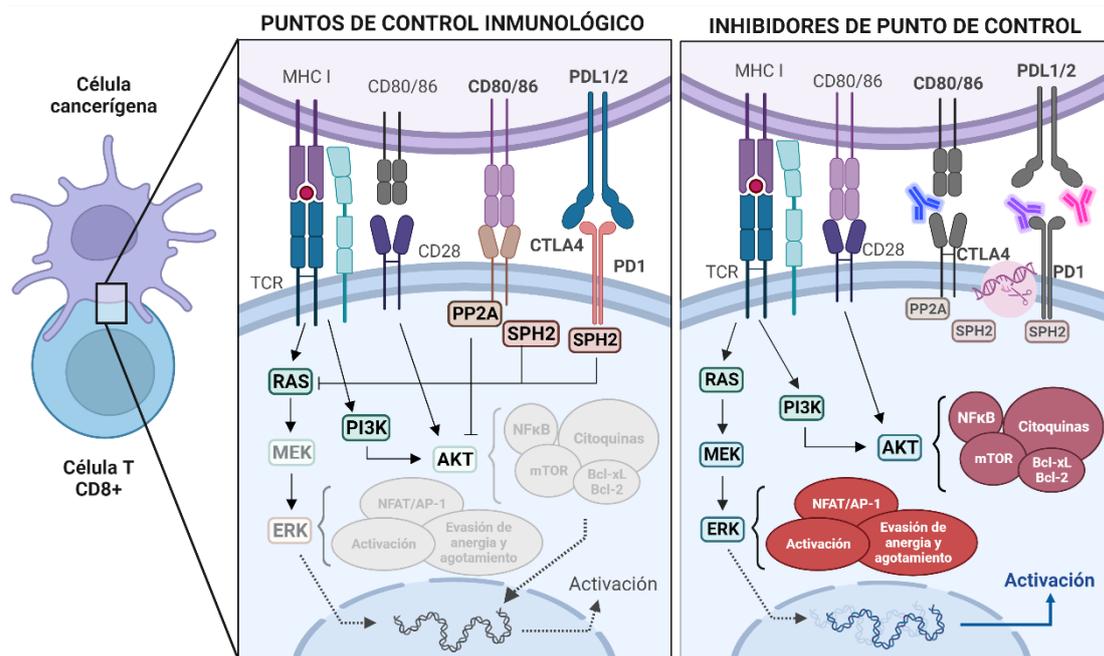
#### **1.4.2 INHIBIDORES DE PUNTO DE CONTROL INMUNOLÓGICO E INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL**

Los **puntos de control inmunológico (IC)**, por sus siglas en inglés, *Immunecheckpoint*) son mecanismos regulatorios que controlan la intensidad de la respuesta inmunitaria, y son esenciales para mantener un **equilibrio** en dicha respuesta. Estos mecanismos de control evitan respuestas excesivas o inapropiadas que se puedan dar en tejidos sanos. El **bloqueo** por

inhibidores de puntos de control inmunológico (ICB, del inglés *Immunecheckpoint-Inhibitors*), representa un punto clave en la investigación del cáncer (Figura 7) (ver punto 2.2).

Existen diversas moléculas involucradas en estos puntos de control entre las que destacan CTLA-4 y PD-1. Aunque existen otras muchas, como el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ , del inglés *Transforming Growth Factor B*), LAG-3 o TIM-3.

En esta introducción nos vamos a centrar en CTLA-4 y PD-1, las dos moléculas más estudiadas como puntos de control inmunológico [62] (Figura 7).



**Figura 7. Esquema representativo la función de los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICB) en los linfocitos T.**

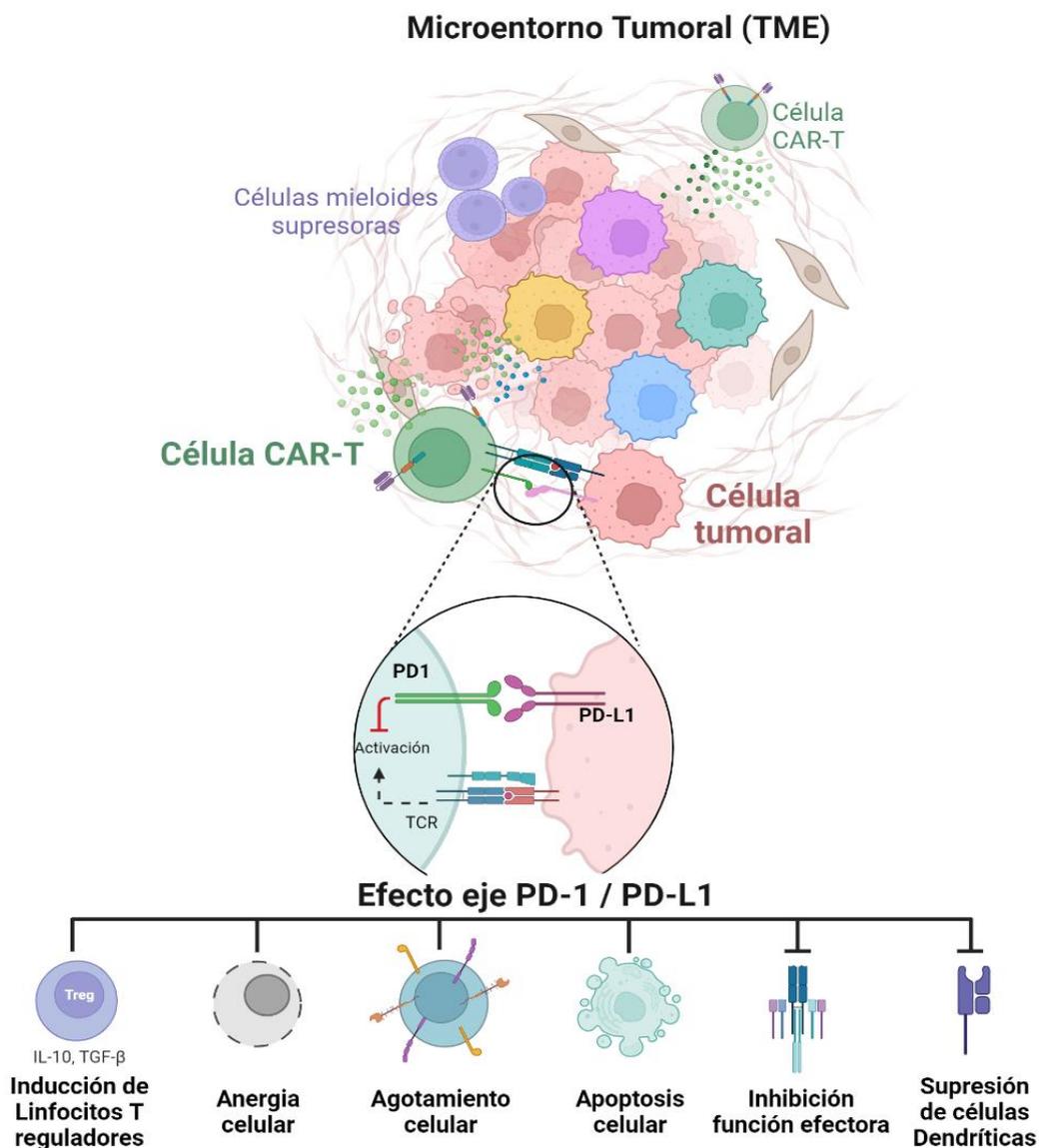
Efecto de los **inhibidores de punto de control inmunológico sobre los linfocitos T**. Las rutas intracelulares de los puntos de control inmunológico se traducen en una **inhibición de la activación de los linfocitos T**, debido a la señalización de las fosfatasa SPH2 y PP2A. Cuando su expresión o señalización se inhibe mediante anticuerpos monoclonales o edición genómica se revierte la señalización intracelular hacia una activación de los linfocitos T. No se verá comprometida, permitiendo así una **evasión a la inducción de energía y agotamiento** y a una **mayor expresión de citocinas citotóxicas, proteínas anti-apoptóticas** y una **regulación al alta del metabolismo celular**. Figura creada con BioRender.com.

**CTLA-4** es un **receptor inhibidor** que pertenece a la subfamilia de inmunoglobulinas CD28 y se expresa principalmente en las células T. Sus ligandos, **CD80** y **CD86**, suelen encontrarse en la superficie de las APCs y unen tanto CTLA-4 como CD28 (ver anteriormente). Al contrario que la interacción CD28-CD80/CD86, que resulta en una señal co-estimuladora muy potente, la unión de CTLA-4 a CD80/CD86 resulta en una señal **inhibitoria, actuando como regulador crucial de la homeostasis de las células T y la auto-tolerancia**. La investigación durante la última década ha demostrado que CTLA-4 actúa principalmente de manera extrínseca a la célula a través de su

competencia con CD28 mediante la trans-endocitosis mediada por CTLA-4 de CD80 y CD86, y sus efectos tolerogénicos directos en la célula con la que interactúa. No obstante, la señalización intrínseca de CTLA-4 se ha relacionado con la movilidad de las células T y la regulación de su localización subcelular, entre otros aspectos [63].

### 1.4.3 EJE PD-1 / PD-L1

PD-1 y su ligando PD-L1 pertenecen a la familia CD28 y son un eje central en la regulación de la respuesta inmune en el TME [64] (Figura 8).



**Figura 8. Esquema representativo de los efectos ejercidos por el eje PD-1/PD-L1 sobre los linfocitos T en el TME.**

El eje PD-1/PD-L1 en las células T dentro del Microambiente Tumoral (TME), suprime la inmunovigilancia y contribuye a la progresión tumoral mediante los siguientes mecanismos:

1. Inducción de **linfocitos Tregs**: La interacción PD-1/PD-L1 contribuye a la diferenciación de células T hacia un fenotipo regulador, disminuyendo la eficacia de la respuesta inmunitaria antitumoral.
2. Secreción de **citocinas inmunomoduladoras**: La expresión de PD-1 en las células T del TME se asocia con la liberación de citocinas inmunosupresoras, creando un entorno propicio para la evasión tumoral.
3. Inducción de **anergia y agotamiento** celular: PD-1 activa mecanismos intracelulares que derivan a la anergia y el agotamiento de las células T, reduciendo su capacidad funcional y eficacia antitumoral.
4. **Apoptosis celular**: La prolongada interacción PD-1/PD-L1 puede desencadenar apoptosis en células T debido al agotamiento celular, comprometiendo aún más la respuesta inmune antitumoral.
5. **Escape Tumoral**: La inhibición de la señalización mediada por el TCR y la presentación antigénica favorece el escape tumoral al limitar la detección y eliminación eficientes de las células cancerosas por parte del sistema inmunitario. Además, este eje inhibe también la segunda señal de los linfocitos T mediante el bloqueo de B2M, interfiriendo en la señalización por parte del MHC.

Figura creada con BioRender.com.

Inicialmente, se identificó que PD-1 se expresaba preferentemente en células apoptóticas [65], lo que le dio el nombre. Pero más tarde se comprendió que, en realidad, es un **punto de control inmunológico crítico** que regula el umbral de las respuestas antigénicas de las células T y B. A diferencia de CTLA-4, que bloquea completamente la co-estimulación a través de CD28 debido a su mayor afinidad por las moléculas B7 (CD80 Y CD86) [66], PD-1 ejerce su función inhibidora de una manera más indirecta aguas abajo de las rutas del TCR.

A pesar de que la vía de PD-1 ha recibido considerable atención por sus roles en el agotamiento de las células T y la inmunosupresión tumoral, PD-1 no es una molécula específica del agotamiento. **PD-1** es también un marcador de las células T efectoras o activadas [67], y generalmente está ausente en las células T<sub>N</sub> y en reposo, pero se induce en todas las células T durante la activación. Varios factores de transcripción regulan la expresión de PD-1 en las células T activadas por antígeno, incluyendo **NFAT** [68] o **T-bet** (también conocido como TBX21) entre otros [69]. Además, la expresión de PD-1 está regulada positivamente por la quinasa de serina-treonina glucógeno sintasa quinasa 3 (**GSK3**) [70], probablemente a través de T-bet. Si el antígeno activador se elimina de manera aguda, los niveles de PD-1 disminuyen en las células T, que responden. Sin embargo, si el antígeno no se elimina, como ocurre en infecciones crónicas y cánceres, la expresión de PD-1 se mantiene alta y sostenida, dando lugar a la anergia celular.

El papel de PD-1 actúa como un regulador negativo sobre la actividad efectora de las células T tras su unión a PD-L1. Los efectos derivados de esta unión se caracterizan por los siguientes procesos iniciados en las células T:

- 1- **Reclutamiento de fosfatasa**. Cuando el TCR se activa, la tirosina intracelular de PD-1, que está unida a su ligando, se fosforila y se activa. Esto da lugar a que **PD-1 reclute SHP-1 y SHP-**

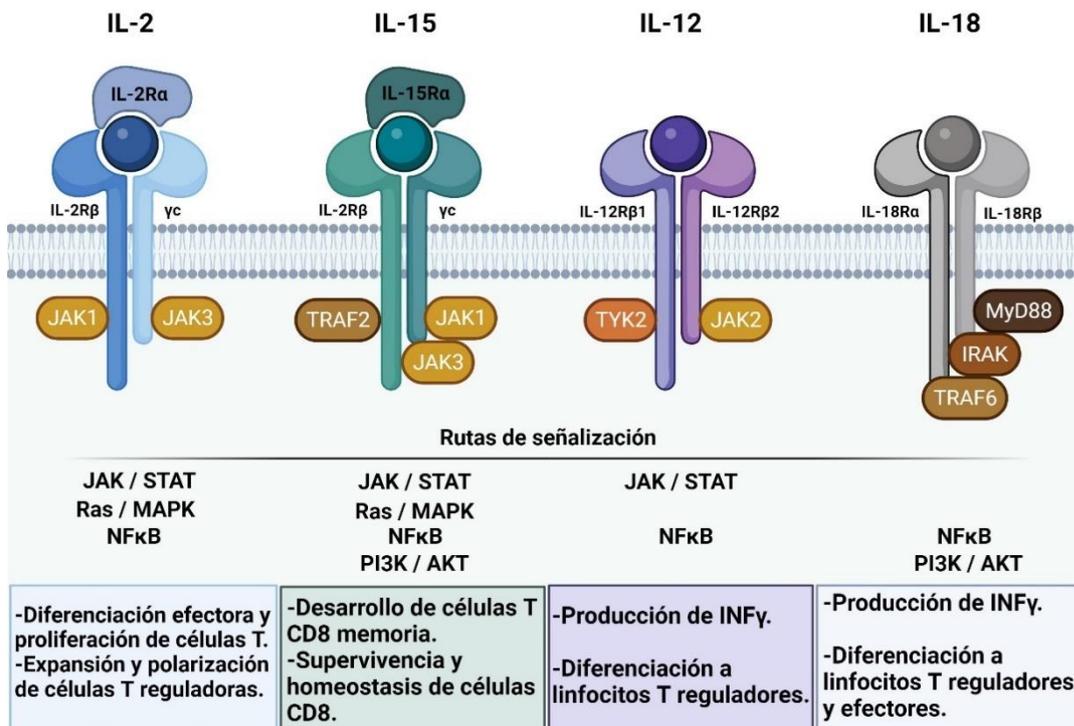
2 (tirosina fosfatasas), **defosforilando tirosinas de CD-3 $\zeta$ , ZAP70** y de moléculas co-estimuladoras como **CD28** [71], conduciendo, por ende, a la **inhibición** aguas abajo **de la señalización PI3K/AKT** y de las vías **RAS/MEK/ERK** [72]. En función de la intensidad de estos procesos, la inactivación de PI3K/AKT puede llegar a reducir la expresión de las proteínas anti-apoptóticas **Bcl-xl** y **Bcl-2** promoviendo la **apoptosis** de los linfocitos T. Simultáneamente, estos procesos promueven la **inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias** por parte de los linfocitos [73]. Además, la activación de PD-1 en determinados contextos puede favorecer la transformación de las células T CD4+ en células Tregs [72][73].

- 2- **Incremento de la expresión de factores de transcripción.** Por otro lado, PD-1 puede inhibir las funciones de las células T al aumentar la expresión de factores de transcripción (ver 1.4.1) como **BATF**, reprimiendo la expresión de genes efectores por parte de las células T como el nivel de secreción de IL-2 [74]. El resultado funcional de estos efectos es múltiple, incluyendo la **inhibición** de la **proliferación** de las células T, su **activación, supervivencia, producción de citocinas, alteración del metabolismo**, funciones líticas de los CTL y finalmente la **muerte** de las células T activadas.
- 3- **Metabolismo de las células T.** La unión de PD-1 también **deteriora el metabolismo de la glucosa** al mismo tiempo que **promueve** la **FAO** tanto en la configuración de la activación primaria como en la estimulación crónica del antígeno [75]. Es importante destacar que la señalización de PD-1 en las células T estimuladas crónicamente induce un **estado metabólico irreversible** que no se revierte con el bloqueo de PD-1, el cual, en cambio, promueve la producción de **ROS** y la **muerte celular** [18].

Estas características derivadas del eje PD-1/PD-L1 no sólo dependen de los niveles de PD-1 en la célula T o de PD-L1 en la célula diana, sino también del entorno (tipos y concentraciones de citocinas y factores de crecimiento) donde se produzca dicha interacción. Una explicación de por qué la función de PD-1 está restringida en la etapa de activación puede ser porque **PD-L1**, además de interactuar con PD-1, también interactúa con **CD80**, interfiriendo en la unión entre PD-1 y PD-L1 [76] CD80 interactúa con PD-L1 en *cis* en las células dendríticas primariamente activadas, interfiriendo así con la capacidad de PD-L1 para interactuar con PD-1 en las células T [64].

## 1.5 PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA RESPUESTA INMUNITARIA

Las **citocinas o interleucinas** son pequeñas proteínas solubles, cruciales para la **homeostasis** de las células inmunitarias y la **regulación** de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Son las responsables de la tercera señal. Las citocinas proinflamatorias se liberan en respuesta al estrés celular para alertar al sistema inmunitario de la presencia de un peligro potencial. Las citocinas presentes en los tejidos premalignos darán forma a las respuestas inmunitarias locales, incluida la actividad de las células citotóxicas innatas (**ILC**) [77].



**Figura 9. Principales características y señalización de receptores de citocinas de la familia  $\gamma c$  (IL-2, IL-15), IL-12 e IL-18.**

**Características distintivas de los receptores de las citocinas IL-2, IL-15, IL-12 e IL-18, destacando las vías intracelulares de señalización asociadas y sus efectos transcripcionales derivados.** En el centro de la figura, se resaltan las rutas intracelulares compartidas, subrayando la convergencia en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B como una característica común a las cuatro citocinas.

**Vías Intracelulares Compartidas:**

1. **NF- $\kappa$ B:** Se destaca como una vía común a las cuatro citocinas, desempeñando un papel central en la transducción de señales hacia el núcleo celular.
2. **JAK/STAT:** Identificada como una ruta compartida entre IL-2, IL-12 e IL-15, esta vía es esencial para la transmisión de señales intracelulares y la modulación de respuestas inmunológicas.
3. **PI3K/AKT:** Compartida por IL-15 e IL-18, esta ruta intracelular desencadena eventos que afectan la supervivencia y proliferación celular.
4. **Ras/MAPK:** Se comparte entre IL-2 e IL-15, contribuyendo a la transmisión de señales que impactan en la proliferación y diferenciación celular.

**Características Específicas de IL-15:**

- IL-15 presenta **todas las rutas comunes** de las citocinas de la familia  $\gamma c$ , subrayando su **versatilidad y la conexión con la señalización intracelular.**

Las citocinas del receptor común gamma ( $\gamma c$ ) ejercen **numerosas funciones en la supervivencia, función y proliferación** de los linfocitos T. Como se ilustra en la **Figura 9**, la familia  $\gamma c$  consta de

seis miembros: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, todos los cuales tienen receptores únicos. Tras la unión a los receptores, las citocinas  $\gamma c$ , a través de JAK1 y JAK3, activan diversas vías de desarrollo, incluyendo las vías STAT1, STAT3, STAT5, MAPK y PI3K/AKT [78]. La única excepción es la IL-4, que además de las vías STAT5, MAPK y PI3K/AKT, activa la señalización STAT6 [78].

La **IL-2**, producida principalmente por células T activadas tras señalización del TCR y co-estimulación, actúa a través del receptor trimérico IL-2R (compuesto por IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  y  $\gamma c$ ) confiriendo propiedades de **proliferación y diferenciación** de células T efectoras, también influye en lisis mediada por **AICD** y modula el desarrollo de células de **memoria** [79]. Los receptores de alta afinidad ( $\alpha\beta\gamma$ ) se encuentran en células T activadas y células Tregs, mientras que los de afinidad intermedia ( $\beta\gamma$ ) están presentes en células NK y células CD8+ de memoria. La señalización de IL-2 impacta en el desarrollo de células T<sub>CM</sub>, células T<sub>EM</sub>, T<sub>EF</sub> y T<sub>EX</sub> [79], así como en la regulación de marcadores asociados con la memoria (Bcl-6, CD127, CD62L) [78].

La **IL-18** regula respuestas inmunológicas innatas y adaptativas a través de su influencia en células NK, monocitos, DC, células T y células B [80]. Pertenece a la familia de las IL-1 y, junto con la IL-12, induce respuestas Th1, promoviendo la producción de IFN- $\gamma$  por células T y células NK. La IL-18 también mejora la expresión de Fas-L y la citotoxicidad mediada por FAS-L en células NK y células T CD8+ [81]. En lesiones premalignas cervicales, la baja expresión de IL-18 se relaciona con un mayor riesgo de progresión a cáncer, respaldando su papel en la activación de respuestas inmunológicas contra células transformadas. Además, IL-18 polariza células T hacia T<sub>EF</sub>, impulsando una respuesta inflamatoria aguda en el microentorno tumoral para mediar efectos antitumorales en células resistentes a los ataques directos de células T. Además, potencia la producción de citocinas Th1 e inhibe la síntesis de IL-10 [82].

La citocina proinflamatoria heterodimérica **IL-12** es conocida por su papel en la activación de la inmunidad antitumoral [83]. Es producida por células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos, e induce la diferenciación de las células T hacia el fenotipo Th1 y la producción de IFN- $\gamma$  en células T y NK [84]. Además, la IL-12 regula negativamente la función y proliferación de las células Treg [85], así como la diferenciación de las células Th2 y Th17 [84]. Se ha observado que diversos polimorfismos genéticos en el gen de la IL-12 que llevan a una disminución en la producción de IL-12 están asociados con una mayor susceptibilidad al cáncer [86].

## 1.6 IL15

La citocina dependiente de  $\gamma c$ , **IL-15**, es una citocina esencial para el sistema inmunológico, y su característica distintiva es su forma bioactiva inusual, un complejo funcional asociado con la cadena **IL-15R $\alpha$**  [87] (**Figura 9**).

El receptor de IL-15 está compuesto por una subunidad  $\beta$  (IL-2R/15R $\beta$ /CD122) y una subunidad  $\gamma$  (CD132) que se comparte con el receptor de IL-2 además de la subunidad  $\alpha$  (IL-15R $\alpha$ ), que le da especificidad al receptor para la citocina IL-15 [88]. Aunque la mayoría de la señalización de IL-15 involucra al complejo IL-15/IL-15R $\alpha$ , IL-15 también puede unirse al receptor IL-2/IL-15R $\beta$ / $\gamma c$  por sí solo y estimular la señalización aguas abajo en ausencia de la subunidad IL-15R $\alpha$ , pero lo hace con una afinidad de unión inferior [89]. En consecuencia, tanto IL-15 como IL-15R $\alpha$  se regulan al alza en células mieloides después de la inflamación, aumentando así la biodisponibilidad de IL-15 [90].

Por tanto, la IL-15 tiene dos modos de ser presentada: mediante *trans*-presentación o *cis*-presentación:

- **Presentación paracrina o *trans*-presentación:** implica la co-expresión de IL-15R $\alpha$  con IL-15, principalmente en monocitos, macrófagos y células dendríticas. Bajo estímulos específicos como interferón tipo I/II, se ensamblan en el retículo endoplásmico formando el complejo heterodimérico **IL-15/IL-15R $\alpha$** . Este complejo anclado en la membrana de la célula presentadora de antígeno (APC) se transmite a las células efectoras adyacentes mediante sinapsis inmunológicas, activando vías de señalización [91]. Este proceso es el mecanismo principal mediante el cual IL-15 opera *in vivo*. Debido a esto, IL-15 puede ser presentado de forma *trans* a IL-2R $\beta$ / $\gamma c$  en células NK y células T CD8+, a diferencia de IL-2 que es principalmente presentado de forma *cis* [92].
- **Presentación autocrina o *cis*:** En **células efectoras** como células NK, células T, células NKT y células B, se **expresa IL-15R $\alpha$**  [93]. La IL-15 soluble (sIL-15), parcialmente secretada extracelularmente, se activa al unirse preferentemente a IL-15R $\alpha$  en las células efectoras. Este proceso se conoce como *cis*-presentación. Permite la entrega local de señales de IL-15 a las células inmunológicas cercanas. A diferencia de la presentación clásica de citocinas donde las citocinas se liberan y se unen a receptores en células lejanas, la *cis*-presentación ocurre en células cercanas a las APCs [91].

### 1.6.1 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE IL-15

La señalización de IL-15 e IL-15R $\alpha$  actúa a varios niveles para incrementar la actividad antitumoral: **activación, proliferación/supervivencia y actividad citotóxica tanto de las células T CD8+** como de las células **NK** [92][94][95]. Entre los mecanismos involucrados destacan: 1) **incremento de genes anti-apoptóticos** como Mcl-1 y Bcl-2, mientras inhibe la AICD [96], 2) **expansión de subpoblaciones memoria** de células T CD8+ a través de la activación de vía FOXO/Eomes e inducción de la biogénesis mitocondrial, 3) promueve la **resistencia a la supresión por Treg** [78] y 4) Inducción de células T<sub>EM</sub> a través de su señalización por la vía STAT5/Bcl-2 [97].

Es por esto, que se le considera un agente prometedor para la inmunoterapia del cáncer [98].

Se conocen tres vías separadas que se activan mediante la unión de IL-15 a sus receptores: las vías de señalización **JAK-STAT, PI3K-AKT** [99] y **Ras-MAPK** [88]. Se inducen **señales proliferativas fuertes** a través de las vías de señalización JAK/STAT y Ras/MAPK, y se evita la muerte celular al **aumentar la expresión de las proteínas antiapoptóticas**, Bcl-2 y Bcl-xL, y **disminuir las proteínas pro-apoptóticas** como Bim a través de la activación de la vía PI3K [97]. Además, se induce la expresión de factores de transcripción como **c-Fos, c-Jun, c-Myc** y **NF- $\kappa$ B** [87]. En un estudio se ha demostrado que la IL-15 induce la proliferación de las células T CD8+ memoria mediante la activación de la telomerasa [88].

### 1.6.2 EFECTOS DE IL-15 SOBRE LAS CÉLULAS T

Un ejemplo de los beneficios derivados de **IL-15** sobre la aptitud celular de los linfocitos T son el aumento de la **longevidad** de las células T<sub>M</sub> al inducir la actividad de la telomerasa a través de las vías de señalización JAK3 y PI3K. Los productos de estas vías, NF $\kappa$ B, STAT, c-Myc, se han identificado como activadores de la transcripción que apuntan al promotor de **TERT** para restaurar y mantener la longitud del telómero, factor limitante para la proliferación celular continua y la longevidad celular [88]. En la misma dirección, IL-15 **respalda la SRC** y **promueve el uso de FAO** para obtener energía mediante una biogénesis mitocondrial mejorada, lo que conduce al **desarrollo de células T<sub>M</sub>** [97] y a su supervivencia a largo plazo regulando la homeostasis y la auto renovación de las mismas [100][101].

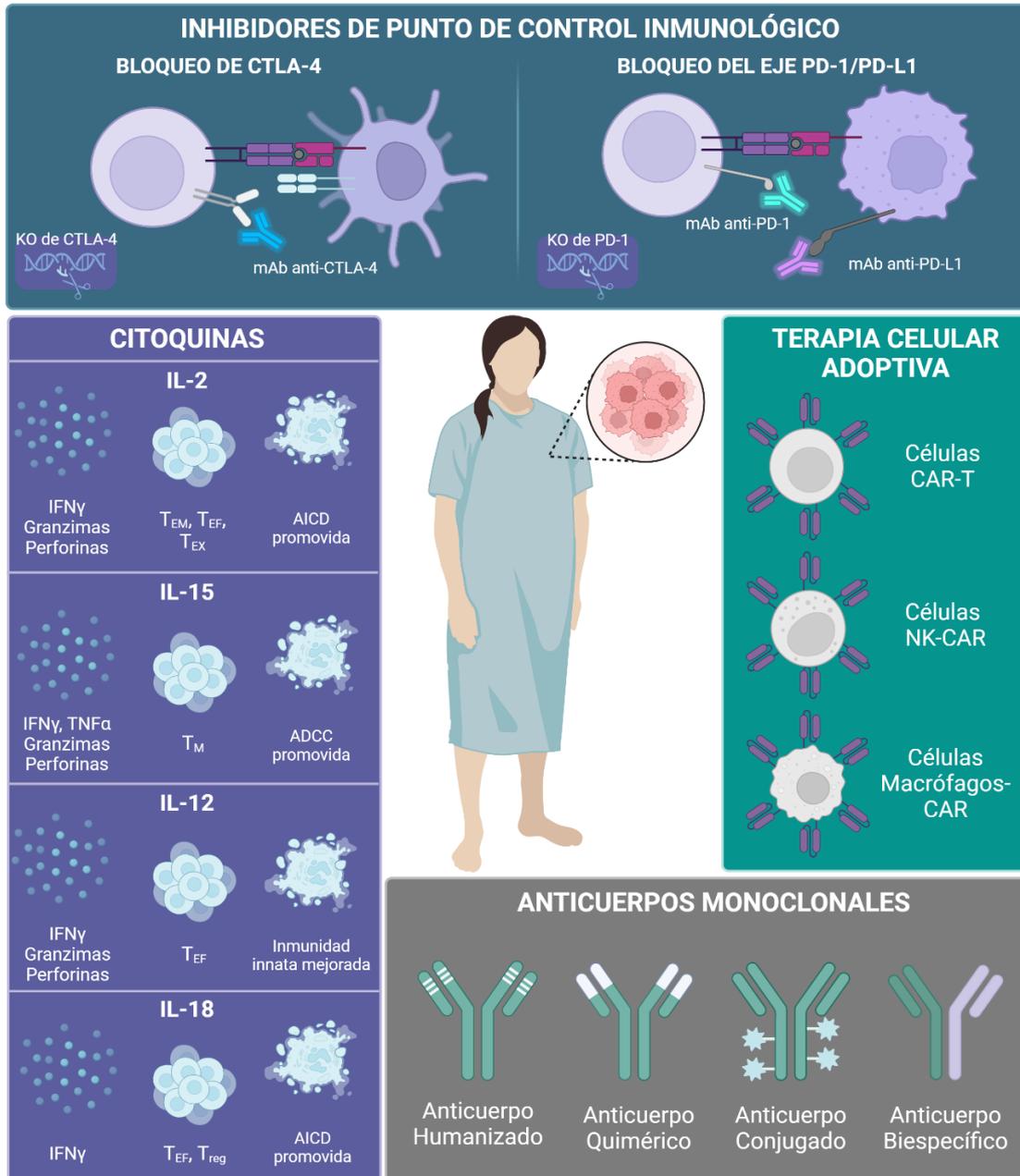
IL-15 también tiene un papel fundamental en la biología de las células T efectoras: La sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 o Bcl-xL inhibe la muerte de las células T<sub>E</sub>,

[97]. Se ha demostrado que la **fosforilación de STAT5**, inducida por IL-15, es necesaria para mantener la expresión de Bcl-2 en las células T<sub>E</sub> y garantizar su **supervivencia** [102].

Por último, se ha demostrado que es crucial para obtener **respuestas antitumorales óptimas** frente a tumores humanos [103]. En esta dirección, en modelos de trasplante y tumores espontáneos, la deficiencia de IL-15 y la reducción subsiguiente en el número de células T y NK conducen al desarrollo acelerado del tumor [104][105], lo que sugiere que IL-15 juega un papel crítico durante las primeras respuestas antitumorales **regulando el número de linfocitos que infiltran el tumor.**

## 2. INMUNOTERAPIA Y CÁNCER

### INMUNOTERAPIA



**Figura 10. Inmunoterapia.**

Figura representativa de las **principales estrategias de inmunoterapia dirigidas contra el cáncer**. La inhibición de puntos de control inmunológico como CTLA-4 o PD-1/PD-L1, el uso de la terapia celular adoptiva (TCA) con células autólogas o alogénicas del sistema inmunológico, el uso de citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-15, IL-12 o IL-18 o el uso de anticuerpos monoclonales como los CAR son las estrategias más utilizadas actualmente para terapias frente al cáncer. Figura creada con BioRender.com.

## 2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA INMUNOTERAPIA

La relación entre el **cáncer y el SI** fue demostrada por Rudolf Virchow hace más de 150 años. El interés en la activación del SI como enfoque terapéutico para tratar el cáncer comenzó a finales del siglo XIX, cuando William Coley fue el primero en asociar la aparición de infecciones postoperatorias con mejores resultados clínicos en pacientes con cáncer [106]. Después de una serie de avances y retrocesos a lo largo del siglo siguiente, la inmunoterapia del cáncer avanzó lentamente hasta muy recientemente, cuando se cambió el enfoque de la inmunidad sistémica al TME y cambió el paradigma de la **inmunoterapia**, logrando resultados clínicos sólidos, estableciendo la inmunoterapia como uno de los principales pilares de las terapias contra el cáncer [107][108].

Cualquier estrategia de inmunoterapia tiene que tener en cuenta los procesos involucrados en la formación de cualquier tumor, donde se produce una evolución de las células transformadas para evitar su destrucción por el sistema inmunitario. El descubrimiento de estos mecanismos ha permitido desarrollar estrategias efectivas frente a determinados tipos de tumores. A este proceso de evolución del tumor en su lucha contra el sistema inmunitario se le denomina **inmunoedición**.

El proceso de inmunoedición del cáncer, definido por Dunn y Schreiber, consta de tres etapas distintas [109]:

- 1) **Eliminación del tumor:** En esta fase inicial, las células tumorales son reconocidas como extrañas y/o generan un daño que provoca una respuesta inflamatoria en los tejidos circundantes. Esto conduce al reclutamiento de células del SI innato, como células NK, NKT, células T  $\gamma\delta$ , macrófagos y DC. Las células NK y los macrófagos desempeñan un papel citolítico al expresar moléculas inductoras de apoptosis, y liberando factores citotóxicos como perforinas y ROS. Las DC migran a los ganglios linfáticos, donde presentan antígenos tumorales a células T CD4+, generando células T CD4+ específicas para el tumor. Estas células, a su vez, activan células T CD8+ específicas del tumor, que migran hacia el TME y lo atacan selectivamente mediante la secreción de perforinas y granzimas, lo que provoca la liberación de más AAT (Antígeno asociado a tumor) y da inicio a otro ciclo de inmunidad contra el cáncer [110].
- 2) **Equilibrio:** En la segunda fase, se establece un equilibrio entre el SI y el tumor. Durante esta etapa, **el tumor adquiere nuevas mutaciones** que lo hacen menos

inmunogénico y más resistente a los ataques del SI. Esto permite a las células tumorales asentarse en los tejidos, pero sin generar daños tisulares severos que puedan poner en peligro al paciente.

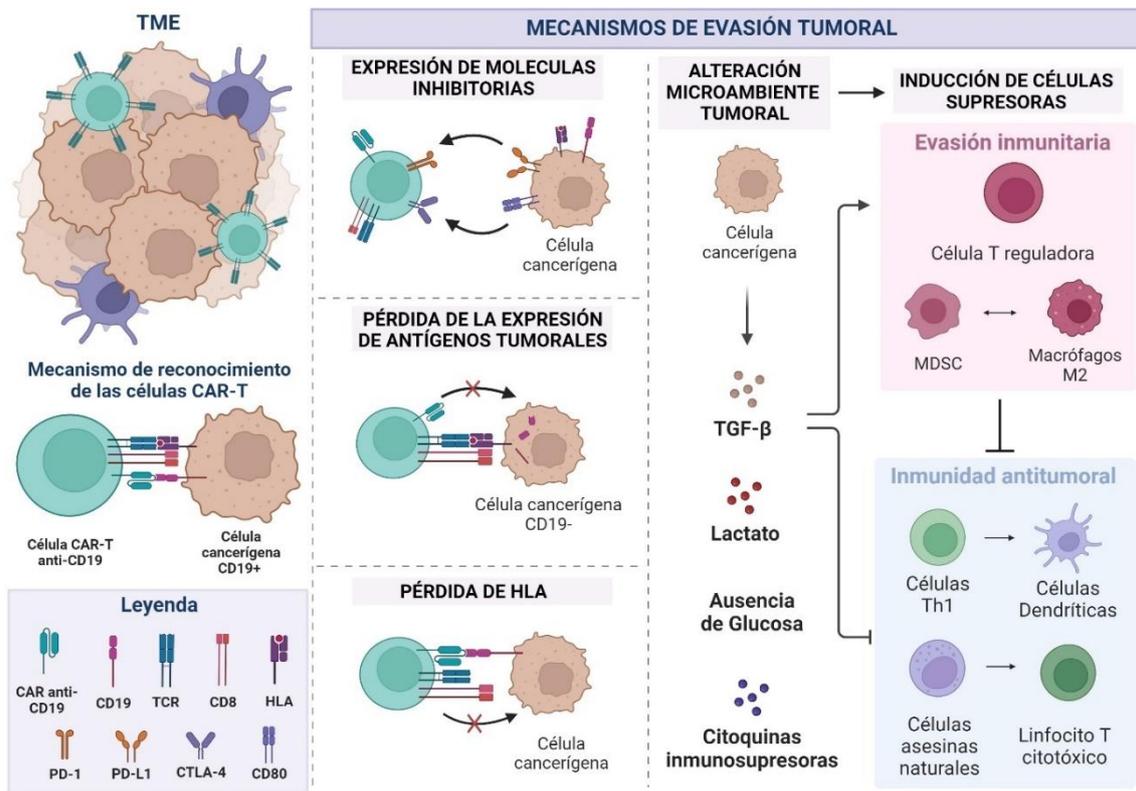
- 3) **Escape (Inmunoescape tumoral):** En la fase de escape, las mutaciones acumuladas en el tumor permiten que evada el reconocimiento por el SI o bloqueen su actividad. Esto permite que el **tumor se expanda** de manera descontrolada, comenzado el proceso donde se pone en peligro la integridad del paciente.

## 2.2. INMUNOESCAPE TUMORAL

La inmunidad desempeña un papel vital en la lucha contra el cáncer a través de la **inmunovigilancia** y las respuestas inmunitarias. La inmunovigilancia es la capacidad natural del cuerpo para **detectar y eliminar células anormales o potencialmente dañinas**, incluidas las células cancerosas. Sin embargo, algunas células cancerosas pueden desarrollar **estrategias para eludir la detección y destrucción inmunitaria**, lo que les permite seguir creciendo [111]. La **evasión inmunológica tumoral** se refiere justamente al fenómeno por el cual las células tumorales incorporan alteraciones sucesivas que las hacen cada vez más resistentes al sistema inmunitario [112][113].

En la **inmunología tumoral**, el objetivo fundamental es comprender estos mecanismos de evasión inmunológica con el fin de desarrollar intervenciones que contrarresten la evasión tumoral y aumenten la capacidad del SI mejorando la eficacia de las respuestas.

A continuación, se describen en detalle las principales estrategias de evasión tumoral:



**Figura 11. Principales mecanismos del inmunoescape tumoral ejercidos por el TME.**

Figura representativa de las principales estrategias llevadas a cabo por las células cancerígenas en el TME para llevar a cabo la evasión tumoral. Las principales estrategias son la **expresión de moléculas inhibitorias**, anulando la función citotóxica de las células T, la **pérdida de la expresión de antígenos tumorales** o del **HLA** evitando así ser reconocidas por los linfocitos T y la **alteración del microambiente tumoral**, secretando moléculas inmunosupresoras favoreciendo, por tanto, a una inducción de la inhibición de la inmunidad antitumoral. Figura creada con Biorender.com

- **EXPRESIÓN DE MOLECULAS INHIBITORIAS.** Los **tumores** implementan estrategias para **evadir o resistir** las respuestas antitumorales de los linfocitos T, estableciendo interacciones con los **puntos de control inmunitario (IC)**, comentados previamente en el apartado 1.4.2. Las vías inhibitorias que están principalmente involucradas en el proceso de escape tumoral son las derivadas principalmente de **CTLA-4** y **PD-1**. Por un lado, los ligandos de CTLA-4 son **B7-1** y **B7-2**, moléculas co-estimuladoras. El CTLA-4 se une a B7 con mayor afinidad que CD28, actuando como un inhibidor competitivo de la co-estimulación de los linfocitos T [114]. Por otro lado, los ligandos de PD-1 son las proteínas **PD-L1** y **PD-L2**, expresadas por muchos tumores y las células circundantes. El interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), producido por los linfocitos T infiltrados en el tumor, induce la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en las células mieloides del microentorno tumoral [115] permitiendo que los tumores y las células vecinas bloqueen las funciones antitumorales de los linfocitos T.

Además de PD-1 y CTLA-4, existen otros RI para los linfocitos que infiltran el tumor como por ejemplo **LAG-3**, **TIM-3**, VISTA, CD244, IDO1, CTLA4, CD160 y BTLA [116]. Al igual que PD-1/PD-L1, estas vías moleculares pueden ajustar finamente el destino celular de los linfocitos T puesto que pueden inhibir las respuestas inmunitarias antitumorales, lo que finalmente lleva a la evasión inmunológica del tumor [74][114].

- **INDUCCIÓN DE CÉLULAS SUPRESORAS.** En el microambiente tumoral, varias células infiltradas en el tumor contribuyen a la **inmunosupresión**, inactivando a los CTL. Ejemplos de estas células son: las células supresoras mieloides (**MDSC**), las células T reguladoras (**Tregs**) y los macrófagos asociados al tumor (**TAM**) o M2 [74][117][118].

Como se ha visto previamente en el apartado 1.3.5.4 de metabolismo, las células cancerígenas además de privar de nutrientes a las células T en el TME, también inducen a la diferenciación de linfocitos T reguladores, los cuales frenan la respuesta de los linfocitos T favoreciendo la progresión tumoral debido, entre otros factores, a la **liberación de citocinas inmunosupresoras** [51].

Las células supresoras de tumores de origen mielocítico (**MDSC**) son precursores mielocíticos inmaduros que se acumulan en la médula ósea, los tejidos linfáticos, la sangre y los tumores suprimiendo las respuestas celulares mediadas por los linfocitos T. Suprimen las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas a través de muchos mecanismos diferentes, como la **secreción de las citocinas inmunodepresoras** IL-10 y TGF- $\beta$ , el estímulo de la **diferenciación de los Treg** y la inhibición de la diferenciación de los CTL y los linfocitos Th1 [74].

Los macrófagos **M2** activados, estrechamente relacionados con respuestas **inflamatorias**, también pueden inhibir la inmunidad antitumoral y promover el crecimiento tumoral [119].

- **ALTERACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.** El TME incluye moléculas de la matriz extracelular (**ECM**, del inglés, *Extracellular Matrix*), **factores de crecimiento**, **nutrientes**, **vasos** tumorales sanguíneos y linfáticos, y **células estromales**, entre otras. Los componentes celulares del TME se caracterizan por una impresionante plasticidad fenotípica sostenida por la comunicación bidireccional entre ellos y con las células tumorogénicas, participando en la resistencia a la terapia dirigida y la inmunovigilancia [19][120]. La interacción entre **competencia por los nutrientes**, **las condiciones físicas** y **la presencia de moléculas bioactivas** crea un **entorno inmunosupresor** en el TME que induce la diferenciación de células T reguladoras reduciendo la **inmunovigilancia** y promoviendo la **progresión tumoral**

[113]. Por ejemplo, las elevadas cantidades de **lactato** producidas por las células cancerígenas se liberan en el entorno extracelular y contribuyen a acidificar el TME, generando así un nicho inmunosupresor donde las células T pierden su capacidad para eliminar tumores [37][120]. Además existe un **microentorno deficiente en glucosa**, donde las células cancerígenas glucolíticas y los TILs compiten por la captación de glucosa generando anergia en los TILs [121].

Por otro lado, los productos secretados de las células tumorales pueden suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales. Un ejemplo de un producto tumoral inmunodepresor es el **TGF- $\beta$** , que secretan muchos tumores e inhibe la proliferación y funciones efectoras de los linfocitos y los macrófagos. Es una de las moléculas inmunosupresoras más importantes en el TME y contribuye a la iniciación y progresión del tumor, bloqueando la secreción de moléculas citotóxicas por las células T CD8+ [122].

- **PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES.** El tratamiento con terapias redirigidas por antígenos se asocia con el riesgo de **pérdida de antígeno/epítipo** y el subsiguiente riesgo de recaída de la enfermedad o a la baja especificidad del tratamiento [123][124]. Este fenómeno se ha denominado **edición inmunitaria**. Dado el elevado índice mitótico de las células tumorales y su inestabilidad genética, son frecuentes las **mutaciones** o eliminaciones de los genes que expresan los antígenos tumorales. Si estos antígenos no son necesarios para el crecimiento de los tumores ni para el mantenimiento del fenotipo transformado, estas células tendrán más posibilidades de crecer frente a la respuesta inmunitaria del paciente [117].
- **PÉRDIDA DE HLA.** A menudo se **inhibe la expresión del MHC clase I** en las células tumorales, de modo que los antígenos tumorales no pueden ser presentados a los linfocitos T CD8+. Probablemente, esta sea una forma más eficaz de evasión inmunitaria que la pérdida de antígeno. Diversos tumores muestran una disminución de la síntesis de las moléculas del MHC clase I o de proteínas necesarias para la expresión del MHC clase I. Estas células tumorales con pérdida de HLA tienen una ventaja de **supervivencia** selectiva porque pueden escaparse de las respuestas inmunitarias mediadas por los CTL [1].

## 2.3. ESTRATEGIAS DE INMUNOTERPIA TUMORAL ACTUALES

A continuación, se describirán brevemente las diferentes estrategias de inmunoterapia tumoral que han sido aprobadas para su uso como medicamentos con especial atención en aquellas relacionadas con el tema de la Tesis:

### 2.3.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (**mAb**) se han convertido en una herramienta inmunoterapéutica fundamental. En la actualidad se consideran una **parte integral de las terapias contra el cáncer**, junto con la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Desde 1997, se han aprobado más de **42 anticuerpos monoclonales antitumorales** para su uso clínico por parte de la **FDA y la EMA** y existen 149 ensayos clínicos en marcha.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se dirigen a los TAA pudiendo **combatir el cáncer** a través de sus mecanismos efectores inherentes (inducción de apoptosis, fagocitosis mediada por anticuerpos o activación complemento) o guiando moléculas citotóxicas (quimioterápicos, toxinas) hacia las células tumorales [125].

Una evolución de los anticuerpos monoclonales vino de la mano de los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos de células T (**BiTE**) capaces de unirse a las células tumorales y a las células T efectoras, con el fin de reclutar y co-localizar células inmunológicamente activas en el tumor [126][127].

### 2.3.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL EJE PD-1/PD-L1

La alta expresión de PD-L1 en el TME hace que las células T se vean rodeadas de un ambiente hostil para ejercer su función lítica (ver apartado 1.4.2.1). La inmunoterapia con anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 ha sido una intervención altamente exitosa para varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, renal, cervical, gástrico, de mama y de pulmón. En ambos casos se pretende **evitar la interacción entre PD-1 y PD-L1** mediante la unión de **anticuerpos** bloqueando la supresión de las células T en el TME. Una vez que se bloquea la interacción PD-L1 / PD-1, las células T preexistentes pueden restaurar rápidamente su función efectora [128].

Esta inmunomodulación ha abierto nuevas perspectivas para el tratamiento del cáncer en la clínica (**Tabla 1**), con algunos anticuerpos ya aprobados, como **durvalumab** (anti-PD-L1), **avelumab** (anti-PD-L1) y **camrelizumab** (anti-PD-1) [129]. Los agentes aprobados como monoterapia incluyen **MPDL3280A** (anti-PDL1 [130]); que utilizan un IgG1) modificado para

eliminar la ADCC al alterar la unión a FcγR, **nivolumab** (anti-PD-1; [131]) y **lambrolizumab** (anti-PD-1; [132]), anticuerpos IgG4 que reducen la ADCC. Además, la mayoría de los pacientes con linfoma presentan una amplificación de PD-L1/PD-L2. De manera coherente, el linfoma es uno de los tipos de cáncer más receptivos a la terapia anti-PD1 donde ofrece una respuesta objetiva del 87% en pacientes con linfoma de Hodgkin recurrente o refractario tratados con nivolumab [133] (Tabla 1).

Además de los productos aprobados como medicamentos, se están evaluando anticuerpos dirigidos al eje PD-1 / PD-L1 en más de 100 ensayos clínicos (clinicaltrials.gov, Noviembre 2023), que abarcan una variedad de tipos de tumores, tanto sólidos como hematológicos, que incluyen melanoma, carcinoma pulmonar no microcítico (CPCNP), linfoma de Hodgkin (LH), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), carcinoma hepatocelular (CH), carcinoma de células renales (CCR) o cáncer urotelial [133].

Sin embargo, a pesar del éxito de los anticuerpos monoclonales para bloquear estos receptores inhibidores, persisten efectos secundarios inflamatorios, la tasa de supervivencia general no mejora significativamente y además, algunos pacientes no responden a esta terapia[132][134][135].

### 2.3.3. CITOCINAS E INTERFERONES

Debido a su efecto regulador de la respuesta inmune a diferentes niveles, el uso de citocinas e interferones ha sido ampliamente estudiado como herramienta para inmunoterapia del cáncer.

Una de las familias de citocinas más estudiadas con estos fines es la del receptor común gamma ( $\gamma_c$ ) debido a que ejercen **numerosas funciones en la supervivencia, función y proliferación** de los linfocitos T [78]. La familia  $\gamma_c$  consta de seis miembros: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, con receptores únicos. Varias de estas citocinas administradas de diferentes formas están siendo investigadas actualmente en cuanto a su potencia antitumoral en diferentes escenarios, muchas de ellas en ensayos clínicos de fase temprana [72][123][136]. En el trabajo de Pearce y cols. [28] han revisado y abordado cómo diversas citocinas  $\gamma_c$  desempeñan roles fundamentales en la homeostasis y biología de los linfocitos T. Además, trabajos preclínicos importantes revelan su potencial para la inmunoterapia a través de varias modalidades: (1) **infusión como monoterapias** o en combinación con la terapia de transferencia adoptiva de linfocitos T, (2) **expansión *ex vivo*** de TIL y células T CAR para generar productos celulares más "jóvenes" y ágiles, y (3) **producción constitutiva o inducible *in vivo*** por células T genéticamente modificadas

(**TRUCKs**) no solo para fortalecer las células transferidas, sino también para mejorar las células inmunitarias en el opresivo TME.

Otro grupo de citocinas muy estudiado para inmunoterapia, son las **citocinas de la familia IL-12**: un grupo de citocinas heterodiméricas únicas que incluyen IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 y IL-39. Estudios recientes han consolidado su importancia en la configuración de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas contra el cáncer y se están estudiando activamente como candidatas para el desarrollo de inmunoterapias [84][116][137][138][139][140].

**Los interferones de tipo I** (IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ ) regulan directamente más de 100 genes con efecto directo en células tumorales, así como indirecto en células inmunes y la vasculatura. De hecho, el IFN $\alpha$ 2 recombinante fue la primera inmunoterapia aprobada por la FDA para el tratamiento del cáncer [141][142].

#### 2.3.4. IL-15

Como se ha comentado previamente en el apartado 1.6, la **IL-15 potencia las respuestas antitumorales** de las células CD8+ T y células NK murinas y humanas [81] y se considera un agente prometedor para la inmunoterapia del cáncer [98].

La señalización de IL-15 e IL-15R $\alpha$  estimula la **activación, proliferación y actividad citotóxica de las células T CD8+** y las células **NK** [92][95] a través de la regulación al alza de marcadores anti-apoptóticos como Mcl-1 y Bcl-2, mientras inhibe la AICD [78]. IL-15 expande preferentemente **subpoblaciones memoria** de células T CD8+ a través de la activación de IL-15 en la vía FOXO/Eomes además de inducir la biogénesis mitocondrial para el mantenimiento de su **metabolismo memoria** [97] mientras promueve la **resistencia a la supresión de Treg** [143].

IL-15 ha sido seleccionada recientemente de entre un gran panel de citocinas, como el único agente que puede expandir significativamente las poblaciones efectoras de células NK y T CD8 en presencia de células tumorales de próstata [144].

En la traducción de estos y muchos más resultados en estudios preclínicos, existen un total de **75 ensayos clínicos en marcha de inmunoterapia combinada con IL-15** para tratar el cáncer. En la actualidad hay 10 ensayos clínicos combinando terapia CAR junto con la expresión de IL-15 en el tratamiento como, por ejemplo, con células NK-CAR para tratar linfoma y leucemia (NCT03774654, NCT05487651, NCT03294954) además de neuroblasoma (NCT04377932, NCT05103631, NCT04715191, NCT05620342). (Clinicaltrials.gov, noviembre de 2023). La terapia combinada de IL-15 con anticuerpos monoclonales anticancerígenos, incluidos rituximab (anti-

CD20) o alemtuzumab (anti-CD52), para pacientes con ATL (NCT02689453), con obinutuzumab (anti-CD20) para pacientes con LLC (NCT03759184), y con avelumab (anti-PD-L1) en pacientes con linfoma de células T (NCT03905135) y cáncer renal han demostrado buenos resultados (NCT04150562) [98][145] (ver **Tabla 4**).

## 2.4. TERAPIA CELULAR ADOPTIVA (TCA)

Otra de las estrategias de inmunoterapia prometedora actual, en parte debido a los avances en la comprensión de la biología celular, ha sido el **uso de células humanas (terapia celular), solas o combinadas con herramientas de modificación genética (terapia celular-génica, ver más adelante)** como producto. La terapia celular se refiere a la transferencia de material celular **autólogo** (del propio paciente) o **allogénico** (de donantes sanos) a un paciente con fines médicos [146]. Las prácticas de terapia celular tienen sus raíces en el siglo XIX y continúan expandiéndose en términos de investigación. La terapia celular se aplica a áreas terapéuticas tan dispares como las enfermedades raras, la medicina regenerativa y el cáncer. Aunque la mayoría de las terapias celulares se encuentran en las etapas iniciales de desarrollo (fase 1/2) existiendo más de mil ensayos clínicos en marcha, existen ya más de 16 medicamentos aprobados por la EMA (Agencia Europea) y la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos), tras modificación genética o no (ver más adelante).

A continuación, mencionaremos brevemente las estrategias de terapia celular adoptiva centradas en el tratamiento del cáncer, con especial énfasis en aquellas estrategias que requieren de modificación genética.

- **TCA BASADAS EN CÉLULAS T.** Las **células T** se han convertido en la elección principal para muchas estrategias de inmunoterapia debido a su facilidad de obtención, expansión y reinfusión en el paciente, lo que las hace compatibles con la práctica clínica. Además, presentan varias características que las hacen ideales para el tratamiento del cáncer: 1) Las respuestas de las células T son específicas; 2) robustas y pueden expandirse significativamente tras su activación; 3) tienen la capacidad de desplazarse al sitio donde se presenta el antígeno; y 4) generan células de memoria que mantienen el efecto terapéutico a largo plazo.

Las células utilizadas en la TCA basada en células T incluyen: linfocitos T infiltrantes de tumor (**TILs**) [147], células **T $\gamma\delta$**  [148], células T específicas para virus (como el producto allogénico recientemente aprobado en el mercado, Ebvallo) [149] y linfocitos T modificados con

receptores específicos de células T (**TCR**) o con receptor de antígeno quimérico (**CAR**) [146] (ver apartado 4).

**Células T TCR transgénicas (TCRt)** [150][151]. Avances significativos en genómica y tecnologías de secuenciación han permitido identificar **secuencias específicas del TCR** que reconoce antígenos tumorales y poder desarrollar células T genéticamente modificadas para combatir el cáncer de una manera altamente específica [152][153]. La terapia con células **TCRt**, ha demostrado efectos terapéuticos prometedores en el tratamiento del melanoma metastásico [154]. A pesar de estos avances, la eficacia terapéutica puede verse comprometida por la evasión de las células tumorales al reducir la expresión de su MHC. Existen **76 ensayos clínicos** ya finalizados para estudiar TCRt en cáncer y más de cincuenta en marcha, como por ejemplo diseñados para neoplasias epiteliales malignas (NCT04520711), o para cáncer de páncreas (NCT05438667).

- **TCA BASADA EN CÉLULAS NK.** Las células **NK** son un componente importante del SI innato del cuerpo [155][156]. Estas células ejercen sus funciones efectoras principalmente reguladas por receptores inhibidores y activadores en su superficie, **sin restricción por el MHC**. El mecanismo antitumoral de las células NK activadas se produce principalmente estimulando la liberación de grandes cantidades de **perforina/granzima** de las células tumorales. Esto promueve la liberación de factores inflamatorios y citocinas proapoptóticas para inducir la apoptosis de las células diana con fines antitumorales [157].

Las células NK autólogas son de fácil obtención y seguras, pero estudios clínicos de fase I han demostrado poca eficacia debido a la susceptibilidad al escape inmunológico causado por la interacción entre moléculas de MHC en células tumorales y el receptor inhibitorio KIR en células NK autólogas.

Con los avances sin precedentes en la terapia con células CAR-T, también ha crecido el interés en la construcción de células NK con receptor de antígeno quimérico (**CAR-NK**) para el tratamiento del **cáncer**. La combinación de la potencia de muerte intrínseca y la potencia de muerte mejorada mediante ingeniería confiere a la terapia con células CAR-NK un gran potencial para mejorar la inmunoterapia del cáncer. Sin embargo, su eficacia se ve limitada por la susceptibilidad al agotamiento. Además, muestran desafíos similares a la terapia con células CAR-T, como la baja infiltración en tumores y el efecto inmunosupresor del microentorno tumoral complican su desarrollo. Dos ejemplos de la TCA mediante la transferencia de células NK son los ensayos clínicos (NCT04538599) (NCT05250362) para tumores hematológicos, (NCT04704856) para cáncer de mama o (NCT05776355) para cáncer de ovario [153].

- **TCA BASADA EN MACRÓFAGOS.** El sistema monocito-fagocítico (MPS) destaca por sus **funciones fagocíticas** [158]. Estas células plásticas pueden acumularse en tumores y atravesar el tejido estromal circundante, presentando nuevas opciones para el tratamiento de **tumores sólidos**. Sus características innatas y su potencial de infiltración, ha promovido el desarrollo de macrófagos CAR (**CAR-M**) para la terapia de tumores sólidos [156]. Aunque CAR-M es un enfoque poderoso de inmunoterapia contra el cáncer, aún existen muchos problemas por superar, incluida la cantidad limitada de células disponibles y la especificidad de fiana tumoral. Se está llevando a cabo un ensayo clínico relacionado con CAR-M en cáncer de mama (NCT05007379). Además, ya se completó un ensayo clínico de fase I con CAR-M para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario recurrente/refractario y mesotelioma peritoneal (NCT03608618). También está en curso un ensayo clínico para el tratamiento de pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 y han sufrido recaída o son refractarios (NCT04660929). Se necesitan ensayos clínicos adicionales para confirmar el efecto real de CAR-M y sus posibles efectos secundarios.

PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICO	LIGANDOS	EXPRESIÓN EN TUMOR U OTRAS CÉLULAS.	MECANISMO DE ACCIÓN	NOMBRE GENÉRICO	AÑO DE APROBACIÓN POR LA FDA	COMBINACIÓN	INDICACION(ES)
CTLA-4	CD80	Células Treg FoxP3+ o células T activadas	CTLA-4 de células T efectoras activadas (Teff)	<b>Ipilimumab</b>	2011	Nivolumab	CCR; CHC; CPCNP
			interactúa con mayor afinidad con el ligando B7 que el receptor CD28, lo que resulta en el bloqueo de la respuesta inmune de células T	<b>(YERVOY® Bristol-Myers Squibb)</b>		Nivolumab y 2 ciclos de quimioterapia doblete de platino	
PD-1	PD-L1 y PD-L2	Células T, células B, monocitos, células NK y macrófagos	PD-1 interactúa con PD-L1 o PD-L2 del cáncer	<b>Tremelimumab</b>	2022	Durvalumab	CE; CECyC; cHL; CPCNP; CCR; CU; CTB
			células para generar efecto inmunosupresor	<b>(Imjudo, AstraZeneca Pharmaceuticals)</b>		paclitaxel	
PD-1	PD-L1 y PD-L2	Células T, células B, monocitos, células NK y macrófagos	y suprime la activación de las células T a través de agruparse con TCR, reclutando el inhibidor fosfatasa SHP2 a través de ITIM e inhibiendo señalización TCR proximal	<b>Pembrolizumab</b>	2014	Pemetrexed y quimioterapia con platino;	CPCNP; CECyC; LH; DLBCL; CU; CCR; GEJ; CE; CIN; HCC; MCC; CSCC; TNBC.
				<b>(KEYTRUD® Merck &amp; Co)</b>		Carboplatino y paclitaxel o	
				<b>Nivolumab</b>	2014	Paclitaxel unido a proteínas; axitinib;	; CPCNP; SCLC;
				<b>(OPDIVO® Bristol-Myers Squibb)</b>		lenvatinib	CCR; cHL; CSCC; CECyC; CU; CHC.
				<b>Cemiplimab</b>	2018	Ipilimumab; Ipilimumab y dos ciclos de quimioterapia doblete de platino	CSCC
				<b>(LIBTAYO® REGENERON and SANOFI)</b>			
				<b>Camrelizumab</b>		Pemetrexed vs quimioterapia	CPCNP; CPCP; CHC;

				(AiRuiKa®)	2021	apatinib	GEJ; cHL
						decitabine	
				Lambrolizumab	2023	Tratamiento adyuvante después de la resección y quimioterapia basada en platino.	CPCNP
				(Keytruda)			
				Durvalumab		Etopósido más carboplatino o	
				(IMFINZI®	2017	Cisplatino (cipsain)	CU; CPCNP; CPCP
				AstraZeneca)			
				Avelumab			
				(BAVENCIO®	2017	Axitinib	MCC; CU; CCR
				Merck			
			Además de unirse a PD-1 y CD80	and Pfizer Inc.)			
			heterodimerizar en cis para activar el			Bevacizumab, Baclitaxel y carboplatino;	
			receptor coestimulador CD28 mientras se reprime			Paclitaxel unido a proteínas y	
PD-L1	PD-1 y	Células tumorales y linfocitos					
	CD80		las vías inhibitoras PD-1 y CTLA-4	Atezolizumab		carboplatino; paclitaxel unido a proteínas;	CU; CPCNP; TNBC; CPCP; CHC
				(TECENTRI®	2016	carboplatino y etopósido;	
				Genentech)			
						Bevacizumab	

**Tabla 1. Lista de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a ICB aprobados por la FDA.**

Tabla representativa de los anticuerpos monoclonales utilizados en tratamientos inmunoterapéuticos frente a los inhibidores de punto de control de los linfocitos T. Se describen los anticuerpos frente a CTLA-4 (Ipilimumab y Tremelimumab), PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab, Camrelizumab y Lambrolizumab) y frente a PD-L1 (Durvalumab, Avelumab y Atezolizumab).

Abreviaturas: Carcinoma endotelial (CE), Carcinoma hepatocelular (CHC), Cáncer colorrectal (CCR), Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), Cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (CECyC), Cáncer de esófago (CE), Linfoma No Hodgking clásico (cHL), Carcinoma urotelial (CU), Carcinomas del tracto biliar (CTB), Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), Adenocarcinoma de unión gastroesofágica (GEJ), Cáncer cervical (CIN), Carcinoma cutáneo de células escamosas (CSCC), cáncer de mama triple negativo (TNBC) y Carcinoma metastásico de células de Merkel (MCC).

## 3. TERAPIA GÉNICA

### 3.1. INTRODUCCIÓN A LA TERAPIA GÉNICA: ADICIÓN GÉNICA VERSUS EDICIÓN GENÓMICA

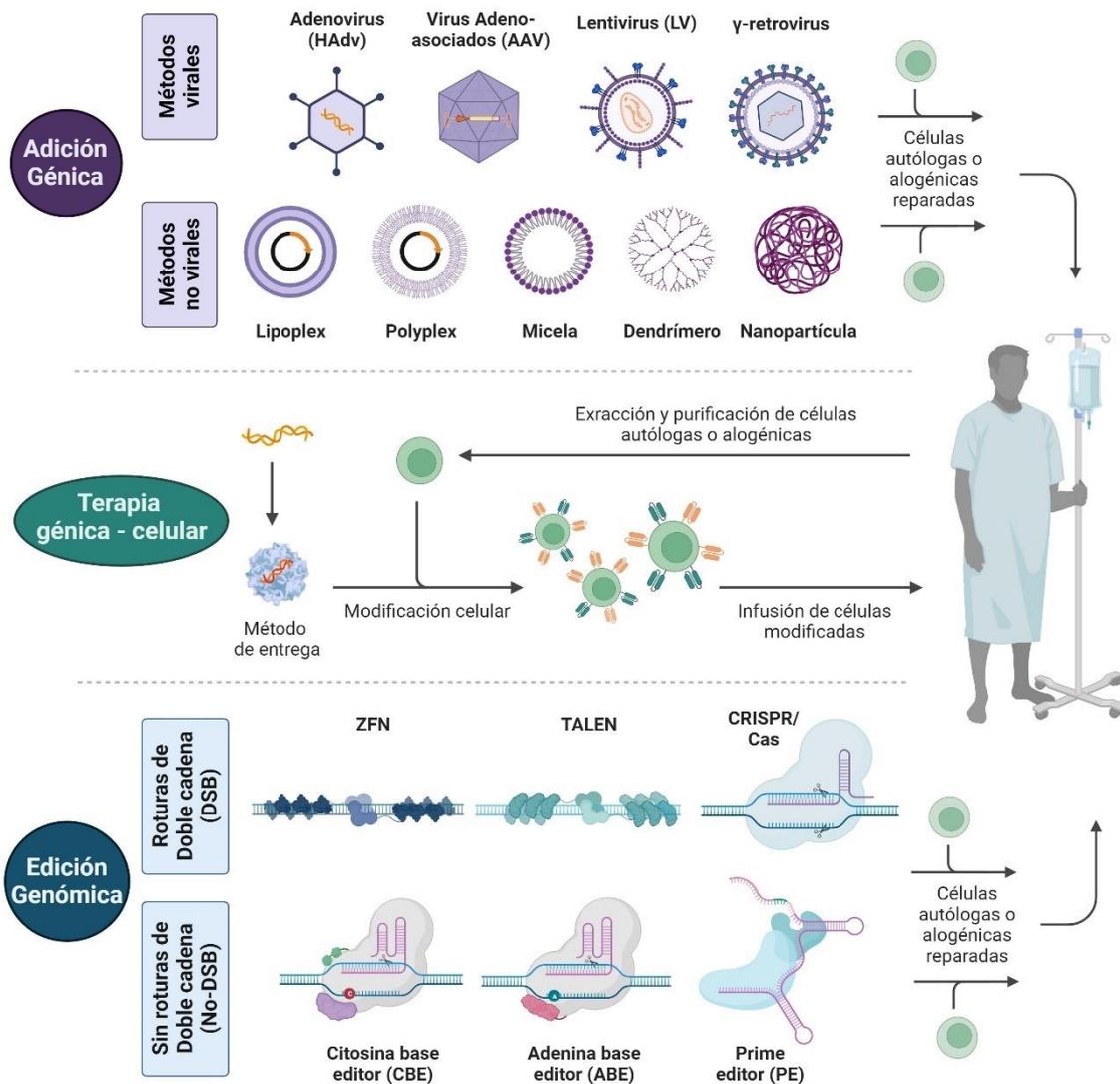
La terapia génica (**TG**) es una disciplina que busca curar, o mejorar la vida de los pacientes mediante **modificación genética**. Para ello, cuenta con multitud de herramientas y estrategias para añadir o eliminar genes y corregir defectos genéticos, así como introducir nuevas funciones a las células diana para tratar diferentes patologías. Actualmente, existen dos enfoques básicos en la terapia génica en función del material introducido: La adición genética (**AG**) y la edición genómica (**EG**).

La **AG convencional** consiste en la entrega de material genético exógeno en forma de ADN o ARN conocido como **transgén**. Este material genético puede codificar para un gen funcional (en forma de ARN o ADN) que reemplace un gen no funcional o añada una nueva función a la célula. También puede ser ARN de interferencia o antisentido, con la finalidad de eliminar o silenciar la expresión de genes tóxicos. Por otro lado, la **EG** consiste en un conjunto de técnicas que permiten, manipular de una manera muy precisa el genoma de la célula diana para corregir el gen mutado, eliminar su expresión y/o introducir nuevo material genético en sitios específicos del genoma.

El primer paso, crucial en cualquier estrategia de terapia génica, es la **eficiente entrega** de las moléculas a las células diana que serán modificadas genéticamente con la actividad terapéutica final. En el caso de la AG, estas moléculas son ARN y/o ADN codificando el gen deseado y, en el caso de la EG, estas moléculas pueden ser ADN, ARN, proteínas o ribonucleoproteínas (**RNP**), codificando para las herramientas de edición genómica (CRISPR/Cas, TALEN, o ZFNs).

Finalmente, esta intervención se puede realizar dentro del organismo (*in vivo*) o fuera de él (*ex vivo*), y para ello se requieren **vehículos de entrega genética** llamados **vectores** [159].

Los vectores de terapia génica son, por tanto, las herramientas básicas sobre las que se edifica estas estrategias. Han de ser altamente eficaces para entregar el material genético dentro de la célula y, a la vez, no provocar efectos indeseados en las células diana.



**Figura 12. Esquema representativo de la terapia génica-celular.**

La terapia génica puede dividirse en dos grandes rasgos: **adición génica** (parte superior) caracterizada por el uso de **vectores virales** (AAV6, Lentivirus, Adenovirus, virus Adeno-Asociados o gamma-retrovirus) y **no virales** (Nanopartículas lipídicas o peptídicas, micelas o dendrímeros, entre otros) y **edición genómica** (parte inferior) caracterizada por estrategias de **generación de roturas de doble cadena (DSB)** mediante el uso de las endonucleasas específicas ZFN, TALEN o CRISPR/Cas o **sin necesidad de generar estas DSB**, como los editores de Base CBE, ABE y PE. Las células modificadas genéticamente, resultado tanto de la adición génica como de la edición genómica, son utilizadas para terapias, constituyendo lo que se conoce como **terapia celular**. (parte central). Figura creada con BioRender.com.

### 3.2. VECTORES: ENTREGA DEL MATERIAL GENÉTICO O DE LOS MODIFICADORES DEL GENOMA

Los vectores de terapia génica han de ser altamente eficaces para entregar el material genético (o los modificadores del genoma) dentro de la célula y, a la vez, no provocar efectos indeseados en las células diana. Existen dos tipos de vectores en función de si derivan de virus o no.

### 3.2.1. VECTORES VIRALES

Los **vectores virales** son vehículos de entrega que han permitido a investigadores y médicos desarrollar **potentes plataformas de medicamentos**, cambiando radicalmente el tratamiento de algunas enfermedades hasta ahora incurables [159][160]. En los últimos 10 años, el campo de la terapia génica ha presenciado una oleada de medicamentos basados en vectores virales que han obtenido aprobación regulatoria con diferentes diseños y propósitos. Estas modalidades van desde terapias contra el cáncer hasta el tratamiento de enfermedades monogénicas con resultados que cambian la vida [159]. Se han desarrollado aprovechando la capacidad de los virus para insertar material genético exógeno con el fin de transferir propiedades beneficiosas a las células o tejidos infectados. De todos los vectores virales existentes, **los basados en adenovirus (Ad), virus adenoasociados (AAV) y los retrovirus (γ-retovirus y lentivirus)** han desempeñado el papel más importante en las terapias de adición génica, consiguiendo la aprobación de varios medicamentos por la **FDA y la EMA** [160].

A continuación, se detallan las características de los dos sistemas virales utilizados en esta tesis doctoral:

#### 3.2.1.1. VIRUS ADENOASOCIADOS

Los **Virus adenoasociados (AAV)** fueron descubiertos como un contaminante durante la preparación de los Ad en el año 1965 por Bob Atchison [161]. Estos virus necesitan la ayuda de otros para poder completar su ciclo de vida [162].

Dado que los AAV no generan ninguna enfermedad en humanos, han sido muy estudiados como herramientas de modificación genética. El genoma de estos virus es de cadena sencilla (**ADNcs**), de una longitud aproximada de **4,8 Kb** flanqueado por **ITRs** (del inglés, *Inverted Terminal Repeat*), esenciales para la replicación del virus [159] y tienen un tamaño de 20nm [159]. Se conocen más de 13 serotipos de AAV con una gran heterogeneidad en la proteína de la cápside, lo que les confiere diferentes tropismos hacia diferentes tejidos y por tanto, facilita la generación de nuevos AAV con diferentes aplicaciones [163].

Hasta la fecha, se han aprobado **5 medicamentos de terapia génica basados en AAV** que han llegado al mercado comercial, todos basados en adición génica y de aplicación *in vivo*:

1. **Glybera** (*alipogene tiparvovec*) que utiliza AAV1 que entrega lipasa lipoproteica (LPL) a pacientes con deficiencia de LPL [160].

2. **Luxturna** (*voretigene neparvovec-rzyl*) [164] utiliza AAV2 para la entrega el gen RPE65 para tratamiento de la enfermedad de Leber.
3. **Zolgensma** (*onasemnogene abeparvovec*), el tercer fármaco basado en AAV y el más recientemente aprobado, que usa AAV para entregar SMN1 como tratamiento de la Atrofia muscular espinal (SMA)
4. **Hemgenix** que utiliza AAV5 para entregar el gen del Factor IX para el tratamiento de hemofilia B [165].
5. **Roctavian** que utiliza AAV5 para entregar el gen del Factor VIII para el tratamiento de hemofilia A [166]. Además de estos medicamentos aprobados, hay más 240 ensayos clínicos.

Aparte de su éxito en las estrategias de terapia génica tradicional (AG), los vectores AAV han sido utilizados como vehículos para **entregar las herramientas de EG** a múltiples tipos celulares [167], tanto en sistemas dependientes de nucleasas como, más exitosamente, en sistemas que utilizan nucleasas específicas (ZFNs y CRISPR/Cas) [168]. El uso de estos vectores como herramienta de entrega genética ha virado para realizar experimentos de *Knock—In* (**KI**, Inserción de un gen) consiguiendo insertar una secuencia de ADN específica tras una formación de roturas de doble cadena (DSB) gracias a los mecanismos de reparación del ADN (ver más adelante). Los AAVs se integran al azar con una cierta frecuencia, que varía dependiendo del tipo celular y que, esta integración se ve incrementada en aquellos AAV con sistema CRISPR en su genoma [169] planteando preocupaciones sobre seguridad a largo plazo.

A pesar de estos avances, el **elevado coste** y su **seguridad** en determinados contextos son dos principales retos que dificultan la aplicación de estos tratamientos a toda la población [160]. Además, aunque son los vectores virales con menor capacidad inmunogénica [160], siguen generando tanto una respuesta humoral como celular, impidiendo la re-inoculación en los pacientes, dificultando algunos tratamientos. Sin embargo, su pequeño tamaño, la facilidad de ser manipulados experimentalmente y su capacidad para transducir células en estado quiescente los hace especialmente útiles para su aplicación [159].

### 3.2.1.2. LENTIVIRUS

La biología de los **lentivirus** (LV) ha sido estudiada extensamente debido a su potencial para ser usados como herramientas de entrega genética. Son virus cuyo genoma se forma por **dos RNA de cadena sencilla** [170], que pasa a ser un ADNdc (ADN de doble cadena) pro-viral a través de un proceso de transcripción reversa complejo [171]. El genoma de estos virus tiene una longitud

de **9.7 kb** y está flanqueado por **LTR** (Repeticiones largas terminales) en sus extremos 5' y 3', siendo esenciales para la replicación del genoma viral [170]. Los LTR están compuestos por secuencias **U5** y **U3** respectivamente, y la secuencia **R**, que es común en ambos extremos. La secuencia *cis*-activa, conocida como *psi* ( $\Psi$ ), se encuentra justo fuera del LTR y es crucial para la encapsulación del genoma viral. Las partículas lentivirales presentan envuelta derivada de las células que han infectado y tienen aproximadamente 100nm de diámetro. Su genoma codifica de tres a seis genes virales (*tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *nef* y *vpu*) además de los tres esenciales para la expresión de las principales proteínas estructurales (*gag*, *pol* y *env*). *Tat* es requerido para la transcripción y la elongación de la polimerasa de ARN II al unirse al LTR. *Rev* orquesta la exportación nuclear del ARN viral al unirse a una región del gen *env*. Los genes auxiliares como *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, aumentan el título viral y la patogénesis del virus [160]. En cuanto a los genes principales, *gag* codifica para las proteínas de la cápside y la matriz protectora, *pol* para la transcriptasa inversa y la integrasa y *env* contiene información para las glicoproteínas de envoltura y transmembrana que determinan el tropismo celular del virus, esencial para la infección y replicación viral [160].

La producción de estos vectores lentivirales (**VLs**) depende de la **separación física en diferentes plásmidos** que expresan las proteínas necesarias para la formación de partículas virales y su infectividad (constructos de empaquetamiento y de envoltura) y secuencias *cis*-activas suficientes para movilizar el genoma viral (el plásmido de transferencia). Este último constituye el núcleo del vector; un genoma viral miniatura sin marcos de lectura abiertos virales (ORFs, por sus siglas en inglés), pero que lleva un casete de expresión para el gen de interés o transgén. Como consecuencia de la eliminación de los ORFs virales del vector de transferencia, los viriones pueden someterse a **una única ronda de infección**, al final de la cual el ADN proviral expresa solo el gen de interés [172].

Estos vectores se separan en **tres generaciones** en función de las modificaciones que han ido sufriendo para su mejora y seguridad para terapia génica. Se generan en células empaquetadoras (generalmente HEK-293T) mediante la co-transfección de **3-4 plásmidos** (para generar LVs de primera y segunda o de tercera generación, respectivamente). En esta tesis se han utilizado **vectores lentivirales de segunda generación, generados a través del sistema de 3 plásmidos autoinactivable** basado en HIV-1. Estos plásmidos contienen, por un lado, el transgén de interés (el **plásmido de transferencia**). Por otro lado, los genes mínimos esenciales para su formación (*Gag/Pol-Rev-Tat*) llamado **plásmido de empaquetamiento** y, por último, VSV-G, basado en el **plásmido de envuelta** viral.

De esta manera las partículas de los VLs tienen una morfología y estructura proteica parecida a la del virus del que deriva, manteniendo las funciones de entrada e integración en el ADN de la célula, pero el genoma que introducen en las células diana carece de todos los genes virales, sólo entrega el gen terapéutico. Estos genes terapéuticos se integran siguiendo un perfil de integración parecido al virus original, con una tendencia muy fuerte a integrarse a sitios activos del genoma y de una manera no específica. Estos vectores tienen una capacidad de empaquetamiento de hasta 9 kb y tienen la **capacidad de expresar múltiples genes a partir de un solo vector** [173]. Además, estos vectores pueden transducir células en **división y células quiescentes**, mientras que otras plataformas basadas en retrovirus, como los vectores  $\gamma$ -retrovirales, requieren una división celular activa para una buena transducción [160].

En la actualidad hay **4 medicamentos aprobados por la FDA que utilizan VLs** como vector de entrega en **células T** para expresar un CAR (del inglés, *Chimeric Antigen Receptor*) para el tratamiento de leucemias, linfomas y mieloma múltiple (Kymriah, Carvykti, Breyanzi y Abecama), y **3 que utilizan células troncales hemtopoyéticas (HSCs)** para el tratamiento de leucodistrofias (Skysona y Libmeldy) y  $\beta$ -talasemia (Zynteglo). Además, hay más de 360 ensayos clínicos realizados o en curso que utilizan estos vectores, 19 de ellos en fase III [GTCT \(a873679\) \(fmpghost.com\)](https://www.fmpghost.com).

Debido a su alta capacidad de empaquetamiento y la posibilidad de transducir células quiescentes, los VLs han sido también estudiados para su uso como vector de entrega de material genético sin que se produzca la integración del mismo en el genoma de la célula diana. Esto puede tener varias aplicaciones; desde la **expresión transitoria** del transgén para tratamiento de patologías que no requieran una expresión continuada, hasta la entrega de **endonucleasas específicas** [170][174]. Esta nueva versión de los VLs es denominada como vectores lentivirales deficientes para la integración o **IDLVs** (por sus siglas en inglés, *Integrase Deficient Lentiviral Vectors*). Esto se consigue mediante la mutación del gen de la **integrasa** (*pol*) en el plásmido empaquetador y generando las partículas lentivirales con este plásmido reduciendo significativamente la posibilidad de mutagénesis por inserción [160]. Estos ADNs quedan entonces de manera episomal en la célula y acabarán diluyéndose con las divisiones celulares permitiendo de esta manera una expresión transitoria.

Una de las aplicaciones de estos vectores no integrativos en el campo de la EG, está relacionada con su capacidad para ser capturados por roturas de doble cadena (DSB) en el ADN [175][176]. Esta característica ha sido utilizada por varios equipos de investigación, incluido el nuestro, para la detección no sesgada de sitios *off-target* generados por endonucleasas [170][176]. Además,

algunos estudios apuntan a que la entrega de los sistemas de edición genómica con IDLVs podrían ser ventajosas frente a otros sistemas de entrega como los AAVs [175].

### 3.2.2. MÉTODOS NO VIRALES

Aunque los vectores virales son, por el momento, los vectores utilizados para la mayoría de los medicamentos de terapia génica aprobados, su elevado coste de producción y la posibilidad de generar respuestas inmunes hace que se busquen alternativas en sistemas alternativos, que no estén basados en virus [159][177]. Los **vectores no virales** utilizados pueden ser **físicos**, basados en la generación de poros mediante pulsos eléctricos o mecánicos, o **químicos**, compuestos por materiales orgánicos e inorgánicos, sintéticos o no [178].

#### 3.2.2.1. MÉTODOS FÍSICOS

Los **métodos físicos** como la electroporación, la microinyección o la sonoporación [179][180], permiten la transfección directamente del material genético o el material de EG a las células diana. La **microinyección** implica la introducción directa de material genético en una célula utilizando una aguja microscópica. Este método es más preciso y se utiliza a menudo para la introducción de material en células individuales. Por otro lado, la **electroporación** y la **sonoporación** se basan en la formación de poros temporales en la membrana celular para facilitar la entrada del material genético, ya sean moléculas grandes, como ADN, ARN o proteínas, en el interior de la célula.

La electroporación implica aumentar la permeabilidad de la membrana celular mediante pulsos eléctricos, pudiendo ser reversible o irreversible según los parámetros utilizados y las características celulares. En la electroporación reversible, se facilita la entrega de material genético o medicamentos, induciendo la muerte celular por distintos procesos; en la electroporación irreversible, se modifica directamente una cantidad significativa de tejido sin efectos térmicos perjudiciales [181]. La electroporación se utiliza, entre otras cosas, como estrategia para entregar a las células diana herramientas de edición genómica descritos más adelante, como CRIPR/Cas9, la endonucleasa utilizada por excelencia en células T y HSCs. Existe ya un medicamento aprobado que utiliza esta tecnología entregar CRISPR/cas9 a células T y editar los locus endógenos del TCR y B2M para terapia CAR (NCT03166878).

### 3.2.2.2. MÉTODOS QUÍMICOS

Los **métodos químicos** utilizan materiales naturales o sintéticos compatibles con el cuerpo humano, de los cuales se deriva su característica no inmunogénica. Existen varios tipos de vectores químicos como las **nanopartículas, liposomas y polímeros** [182][183].

Los sistemas de administración basados en **lípidos** son las nanoestructuras más investigadas en el campo del tratamiento farmacológico. Se basan en el uso de **nanopartículas lipídicas (NPL)** que suelen contener fosfolípidos, colesterol, lípidos ionizables y un lípido PEGilado [184]. Se estima que en la actualidad se han introducido más de 50 nanofármacos en el mercado y están siendo ampliamente estudiadas en el campo de la terapia génica. De hecho, las vacunas contra el COVID más eficaces entran dentro de esta categoría: nanoliposomas para entregar ARN [159]. Por otro lado, las **NPs de polímero (NPP)** [185] son partículas coloidales cuya estructura macromolecular les permite transportar moléculas de ADN grandes y la parte externa soluble en lípidos facilita la capacidad de cruzar las membranas celulares [186].

Diferentes sistemas basados en nanopartículas se han explorado para desarrollar células CAR-T mejoradas. La versatilidad en tamaño, características de superficie y los perfiles de liberación de las moléculas, los convierte en una herramienta muy potente para el campo de la terapia génica, incluyendo las células CAR-T. De hecho, en la actualidad se encuentra en proceso un estudio clínico utilizando nanopartículas para entregar el CAR (MT-302) a pacientes con cáncer metastásico epitelial (NCT05969041).

### 3.3. EDICIÓN GENÓMICA (EG)

EG es un campo bien establecido en las últimas décadas, permite realizar **cambios precisos en el ADN o ARN** para investigar y tratar enfermedades [179]. Estos cambios pueden ser pequeños o extensos y se logran mediante diversas estrategias. Se dividen en dos categorías principales:

- La primera implica crear **roturas en el ADN** de doble cadena (**DSBs**) en ubicaciones específicas (*Knock-Out, KO*), seguidas o no de la inserción de ADN externo (*Knock-In, KI*). A pesar de la eficacia de las endonucleasas, la inducción de DSBs por estas herramientas puede tener efectos secundarios no deseados, como inserciones o deleciones en locus fuera del objetivo (también llamados sitios *off-target*), eliminaciones grandes y translocaciones.
- Para abordar los problemas de seguridad derivados de la generación de DSBs, se han desarrollado sistemas alternativos que permiten la **edición del genoma sin generar DSBs** [122]. Estos sistemas incluyen el uso de vectores virales que contienen ADN donador para

activar mecanismos de reparación, Cas9 mutados para cortar el ADN de una sola hebra. Son la edición de bases (**BE**) [187], que permite realizar cambios puntuales en secuencias de ADN y ARN sin romper el ADN, y los re-escritores del ADN como son los sistemas PRIME editing (**PE**) [188]. Es importante apuntar que, a pesar de no generar DSB, todos los sistemas de edición han de ser evaluados con precisión para determinar la eficacia y especificidad de la modificación deseada. Esto es así porque, si bien es verdad que la ausencia de DSB reduce las inespecificidades, no las reduce por completo [189][190].

Dado que todas las estrategias de edición genómica requieren de los mecanismos de reparación del ADN para conseguir el efecto deseado, en primer lugar, comenzaremos explicando brevemente estos procesos, después explicaremos las diferentes endonucleasas específicas existentes, con especial énfasis en el sistema CRISPR/Cas. Finalizaremos analizando las dos estrategias de edición genómica utilizadas en esta Tesis: Knock-Out y Knock-In basadas ambas en la generación de DSBs.

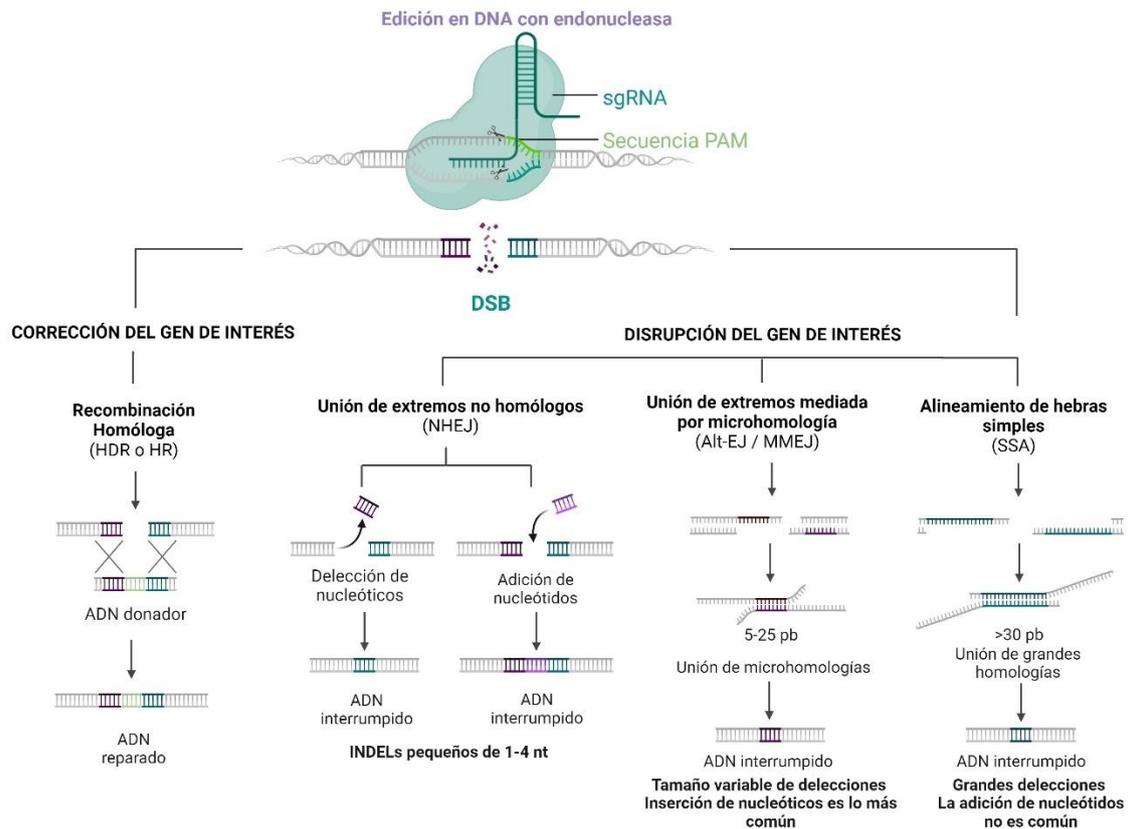
### 3.3.1. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

Las roturas de ADN no reparadas o incorrectamente reparadas pueden bloquear el procesamiento de ADN esenciales, provocar inestabilidad en el genoma y, potencialmente, la muerte celular. En respuesta a estos posibles riesgos, las células han desarrollado múltiples mecanismos para reparar los genomas dañados (**Figura 13**). En general, se cree que la **resección de extremos** determina el resultado de la reparación de roturas de doble cadena (DSB) [191]. Cuando se interrumpe la resección de extremos, las DSB de extremos romos se reparan mediante la unión de extremos no homólogos (**NHEJ**) [179][191] sin una plantilla homóloga, que actúa rápidamente una polimerasa propensa a errores (Pol  $\mu$  o Pol  $\lambda$ ) uniéndose a los extremos del ADN, lo que a menudo resulta en la inserción y/o eliminación de pequeñas secuencias (**INDELS**) de menos de 20 pares de bases pudiendo llevar a la inactivación de un gen (estrategia de **KO**) si la mutación ocurre en la región codificante del mismo. Alternativamente, se pueden utilizar vías basadas en la homología, como la recombinación homóloga (**HR o HDR**) [192], que es menos frecuente y ocurre principalmente durante las fases S y G2 del ciclo celular. Dependiendo de la secuencia del ADN entregada, puede utilizarse para corregir la mutación o insertar una nueva secuencia en el lugar de la rotura (estrategia de *Knock-in*, **KI**) [193].

Otros mecanismos de reparación incluyen la unión de extremos alternativa (**alt-EJ**), también conocida como unión de extremos mediada por microhomología (**MMEJ**) y el alineamiento de hebra simple (**SSA**) [191][194]. Ambos mecanismos implican el alineamiento de secuencias con

regiones de (micro)homología después de la resección de los extremos del ADN. En los procesos de alt-EJ, la polimerasa Pol  $\theta$  estabiliza el alineamiento de las microhomologías (que pueden variar de 2 a 10 pares de bases) y extiende la secuencia del ADN utilizando la otra hebra como plantilla. Esto resulta en la eliminación de la región del ADN entre las microhomologías, lo que genera una deleción de longitud variable. Para que se produzca el SSA, las regiones de homología deben ser más extensas, normalmente de más de 20 pares de bases, lo que a menudo da lugar a grandes deleciones [193].

El modo de acción de las endonucleasas dirigidas a sitios específicos de ADN, se basa en la escisión del locus específico mediante nucleasas específicas junto con la posterior activación de los mecanismos de reparación del ADN de la célula: HDR y NHEJ principalmente [122][179].



**Figura 13. Desglose global de las diversas rutas de reparación del material genético (ADN) tras la generación de roturas de doble cadena inducidas por endonucleasas específicas.**

Las **roturas de doble cadena (DSBs)** generadas por endonucleasas específicas, como en el caso de CRISPR/Cas9, pueden ser **reparadas mediante diversos mecanismos**. La eliminación de segmentos en el extremo del ADN constituye la característica primordial que determinará la elección entre una u otra vía de reparación.

Cuando hay escasa o nula eliminación, el mecanismo de unión de extremos no homólogos (**NHEJ**) se encarga de reparar el DSB. Este proceso es mediado por polimerasas propensas a cometer errores (Pol  $\lambda$ , Pol  $\mu$ ), dando lugar a inserciones y/o deleciones (indels) de pequeña magnitud (<20 pares de bases), interrumpiendo así el gen. Si, junto con la rotura, proporcionamos un ADN donante con brazos de homología de la región objetivo, se activa el mecanismo de recombinación homóloga (**HDR**), reparando de manera precisa el DSB. Esta propiedad puede emplearse para corregir una mutación o introducir una nueva secuencia. Cuando se produce alguna eliminación en el extremo y se evidencian microhomologías (2-10 pares de bases), el ADN se repara mediante unión de extremos alternativa (**alt-EJ/MMEJ**), utilizando la Pol  $\theta$ , generando deleciones de tamaño pequeño a mediano, así como inserciones. Si la eliminación es más extensa y se observan homologías (>20 pares de bases), se favorece la vía de alineamiento de hebra única (**SSA**), generando deleciones de gran magnitud. Figura creada con BioRender.com.

### 3.3.2. ENDONUCLEASAS ESPECÍFICAS

Las primeras **endonucleasas específicas (SENs)** del inglés, *Specific Endonucleases* generadas para crear DSBs con  **fines de edición del genoma** fueron inicialmente las Meganucleasas (**MegNs**), un grupo de endonucleasas que reconocen secuencias de ADN de 12 a 45 pares de bases [179]. Posteriormente, herramientas de edición genómica más versátiles fueron desarrolladas con el uso del dominio catalítico FokI y dominios de dedos de zinc para generar las primeras **ZFNs** [195]. Poco después, se diseñaron las **TALENs** [196], basadas en el sistema bacteriano de TAL efectores (TALEs). Por último, con su diseño simple, el sistema **CRISPR/Cas** es la herramienta de edición genética más versátil [197]. Se deriva de bacterias, en particular de un sistema inmunitario adaptativo presente en procariontes, que brinda defensa contra infecciones virales y plásmidos. Las proteínas CRISPR/Cas forman un complejo con moléculas de ARN que guían a las endonucleasas Cas hacia el ADN objetivo-exógeno a cortar [193].

Se han llevado a cabo **15 ensayos clínicos** utilizando nucleasas de dedos de zinc (**ZFN**) y **8** utilizando nucleasas **TALEN**. En cuanto a CRISPR/Cas9, existen un total de **105** ensayos registrados con **CRISPR**, entre los 87 de ClinicalTrials.gov, 11 reflejados en la ICTRP y 17 en la ICMJE, incluidos los registros de Ensayos Clínicos de China (ChiCTR) y de la India(CTRI)[198]. Estos ensayos clínicos con CRISPR se han clasificado según los tipos de enfermedad: 35 de ellos están relacionados con el cáncer (42%), el segundo sistema más estudiado es el sistema hematopoyético (21%), ocho ensayos clínicos (10%) se centran en el sistema respiratorio, de los cuales 5 tratan sobre la COVID-19. También, se han estudiado trastornos relacionados con el sistema endocrino, nutricional o metabólico en 7 casos (8%). El resto de los ensayos clínicos están basados en la infección por VIH, trastornos en los sistemas visual y esquelético, etc [198].

Como puede observarse por el número de ensayos clínicos y la entrada en fase III de varios de ellos, a pesar de que el sistema **CRISPR/Cas** es la plataforma más reciente en el campo de la edición de genomas, es el más utilizado en ensayos clínicos y además, se ha autorizado por la FDA el primer medicamento basado en esta SEN, **exa-cel** [199].

CRISPR/Cas se conoce como la tercera generación de herramientas de edición genómica y es la endonucleasa seleccionada para realizar los experimentos de esta tesis doctoral. El sistema CRISPR fue descubierto en la década de los 80 por el Dr Francis Mojica y se denominó “sistema asociado a CRISPR” o Cas.

Las proteínas Cas codificadas por estos genes tienen dominios funcionales similares a endonucleasas, helicasas, polimerasas y proteínas de unión a nucleótidos. Además, se comprendió el papel de los CRISPR como sistema de **inmunidad adaptativa bacteriana y arqueal** contra bacteriófagos invasores [200]. A diferencia de las tecnologías anteriormente mencionadas, en las que el reconocimiento del sitio diana de ADN se basaba en el reconocimiento de la secuencia mediante proteínas artificiales requiriendo interactuar con el ADN, en este caso se basa en interacciones **ARN-ADN** donde el ARN se considera como ARN guía (**ARNg**). Esto ofrece varias ventajas incluyendo un diseño sencillo para cualquier secuencia diana, una predicción de los sitios fuera de diana (*off-target*) y la posibilidad de modificar varios locus simultáneamente (multiplexado). Los sistemas CRISPR-Cas son diversos y se han clasificado en dos clases, seis tipos y más de 20 subtipos según la disposición del locus y los genes cas característicos [201][202].

Aunque en el sistema original el ARN guía (**ARNg**) se compone de dos moléculas de ARN: una específica para el ADN diana (ARNcr) y otra que interactúa con la proteína Cas9 (ARNtracr) [191], se ha demostrado que el sistema también puede funcionar con una sola molécula de guía de ARN (**ARNsg**) [203]. Tanto los complejos ARNcr:ARNtracr:Cas9 como ARNsg:Cas9 harán que Cas9 reconozca de manera específica la secuencia de motivo adyacente al protospaciador (**PAM**), que, en el caso de *S. pyogenes*, consiste en **NGG** (donde N puede ser cualquier nucleótido) seguido de la posterior creación de DSB aproximadamente 3-4 pares de bases antes de la secuencia PAM. Esta rotura de doble cadena específica del ARNcr en la secuencia diana, se resuelve mediante HDR o NHEJ.

	<b>Meganucleasas (MegNs)</b>	<b>ZincFinguer (ZFN)</b>	<b>TALEN</b>	<b>CRISPR/Cas9</b>
<b>Sitio de reconocimiento</b>	Entre 14 y 40 pb	Normalmente, de 9 a 18 pb por monómero ZFN, de 18 a 36 pb por par de ZFN	Normalmente, de 14 a 20 pb por monómero TALEN, de 28 a 40 pb por par de TALEN	22 pb (secuencia guía de 20 pb + motivo adyacente protoespaciador (PAM) de 2 pb para <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9); hasta 44 pb para doble mellado
<b>Especificidad</b>	Se tolera un pequeño número de mismatches posicionales	Se tolera un pequeño número de mismatches posicionales	Se tolera un pequeño número de mismatches posicionales	Se toleran mismatches posicionales y múltiples consecutivos
<b>Inmunogenicidad</b>	Desconocido; Las meganucleasas pueden derivarse de muchos organismos, incluidos los eucariotas.	Probablemente bajo, ya que los dedos de zinc se basan en una estructura de proteínas humanas; FokI se deriva de bacterias y puede ser inmunogénico.	Desconocido; proteína derivada de <i>Xanthomonas</i> sp.	Desconocido; Proteína derivada de varias especies bacterianas.
<b>Facilidad como método de entrega <i>ex vivo</i></b>	Relativamente fácil mediante métodos como la electroporación y la transducción viral.	Relativamente fácil mediante métodos como la electroporación y transducción viral.	Relativamente fácil mediante métodos como la electroporación y la transducción viral	Relativamente fácil mediante métodos como la electroporación y la transducción viral.
<b>Facilidad como método de entrega <i>in vivo</i></b>	Relativamente fácil ya que el tamaño pequeño de las meganucleasas permite su uso en una variedad de vectores virales	Relativamente fácil ya que el tamaño pequeño de los casetes de expresión ZFN permite su uso en una variedad de vectores virales	Difícil debido al gran tamaño de cada TALEN y la naturaleza repetitiva del ADN que codifica los TALEN, lo que lleva a eventos de recombinación no deseados cuando se empaqueta en vectores lentivirales.	Moderado: el Cas9 comúnmente utilizado de <i>S. pyogenes</i> es grande y puede imponer problemas de empaquetado para vectores virales como el AAV, pero existen ortólogos más pequeños.
<b>Facilidad para multiplexar</b>	Baja	Baja	Baja	Alta

**Tabla 2. Tabla comparativa y descriptiva de las características de las endonucleasas.**

Tabla representativa de las características de las **MegNs, ZFN, TALEN y CRISPR/Cas9**. Las meganucleasas son moléculas con una parte que identifica el ADN y otra que lo corta; para que ocurra el corte, estas moléculas deben unirse en dímeros. Las nucleasas dedo de zinc (ZFNs) requieren la formación de dímeros de dos nucleasas FokI para realizar el corte. Cada dedo de zinc interactúa con tres nucleótidos en la secuencia objetivo. Las nucleasas de actividad similar al activador de transcripción (TALENs) llevan a cabo el corte mediante dos FokI, cada uno asociado a un TALE que contiene 34 secuencias repetidas de aminoácidos. En cuanto al sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated System*), emplea un ARN guía para dirigir la nucleasa Cas9 y realizar el corte en el ADN objetivo. El sitio de destino está flanqueado por una secuencia PAM (motivo adyacente de protoespaciador), y el corte se produce 3 pares de bases aguas arriba del PAM.

### 3.3.3. ESTRATEGIAS KNOCK-OUT (KO)

Hay varios mecanismos para lograr el **silenciamiento (KO) de un gen**:

- a) Mediante el diseño de un ARNg específico, seleccionando la **región exónica** deseada en función de la estrategia que se quiera llevar a cabo. Es decir; por ejemplo, se puede editar la región transmembrana de una proteína, evitando su anclaje a la membrana.
- b) Otra estrategia de silenciamiento es editar la secuencia cercana al 3' del **ATG**. De esta manera se cambia la pauta de lectura en alrededor de 2/3 de las secuencias editadas y la proteína no podrá ser expresada.
- c) Otra estrategia bastante utilizada se centra en la edición de regiones *Splice Donor-Splice Acceptor (SD-SA)* para modificar el proceso de *Splicing*, generando una proteína truncada, o la ausencia de proteína.
- d) Además del uso de un único guía, también se puede usar varios como por ejemplo para llevar a cabo la eliminación (delección) de **ambos extremos** de un exón o de una secuencia específica.
- e) Por último, es también factible utilizar hasta **tres guías dirigidos frente al mismo gen**, obteniendo una eficiencia de eliminación más alta que cualquier guía individual por sí sola, al combinar varios mecanismos.

Sea cual sea la estrategia utilizada, cuando ocurren DSB en las células, la primera reacción para reparar el ADN suele llevarse a cabo por la vía NHEJ. Como se ha mencionado anteriormente, la NHEJ se puede clasificar en dos tipos: NHEJ canónica (c-NHEJ) y NHEJ alternativa (alt-NHEJ), también llamada MMEJ [191][203]. En la NHEJ, esta resección de extremos implica la degradación de regiones cortas de los nucleótidos sobresalientes de 5' o 3' mediante actividad exonucleasa o endonucleasa para exponer o generar pequeñas regiones de microhomología ( $\leq 4$

nucleótidos) entre las hebras, pudiendo facilitar la unión de extremos [204]. Los **INDELS** generados por NHEJ y MMEJ que no son múltiplos de tres pueden causar una **mutación frameshift**, interrumpiendo secuencias codificantes de proteínas, lo que suele resultar en una **eliminación funcional del gen (KO)**.

En los últimos años se ha desarrollado los **BE**, que permiten generar **cambios específicos de un nucleótido por otro**, generando un cambio de aminoácido o un codón stop. Igualmente, los **PE** permiten generar eliminación de genes de manera precisa. Pero dado que ambos sistemas están en fases de desarrollo y que no se han utilizado en esta tesis, no abordaremos este tema en mayor profundidad [205].

### 3.3.4. ESTRATEGIAS KNOCK IN (KI)

Se han desarrollado numerosos avances para aumentar la edición del genoma mediada por CRISPR-Cas en relación con la generación de inserciones dirigidas mediante la vía de **HDR**. La HDR es una vía de reparación fiel que entra en acción principalmente en la fase S o G2 del ciclo celular y requiere secuencias de ADN homólogas [203]. Por tanto, la integración llevada a cabo por HDR es muy precisa [122]. La **recombinación homóloga** es el mecanismo utilizado para la **edición precisa del genoma**, lo cual solo ocurre en presencia de una **plantilla** dúplex homóloga para reparar las **DSB**. Se han utilizado **plantillas de reparación de ADN** de doble cadena (**ADNdc**) como por ejemplo productos de PCR, plantillas de reparación de ADN de cadena simple (**ADNcs**) entregados como AAV6 [206][207] o con otros métodos de entrega [208][209]. También se han utilizado plantillas de ARN de cadena simple (**ARNsc**) entregados como los IDLV [175] además de plantillas de reparación de ADN modificadas químicamente en intentos de aumentar las eficiencias de HDR para generar modelos animales [210].

Esta tecnología es uno de los métodos más comúnmente utilizados en la actualidad para introducir una mutación genética en un locus preciso del genoma (**KI**), permitiendo modificaciones genéticas deseadas y controladas, a diferencia de la transducción viral que se caracteriza por integraciones semi-aleatorias en el genoma.

Este enfoque, generalmente utiliza la electroporación para entregar, además de la RNP con su ARNg, una plantilla de reparación de ADN. Por tanto, tras el corte generado por CRISPR/Cas9, la maquinaria de reparación de ADN celular basada en la HDR se activa para reparar el sitio de corte de CRISPR/Cas9.

El método de entrega más comúnmente utilizado en el campo del KI son los vectores virales basados en virus adenoasociados (**AAV**), seleccionando el serotipo de interés en función de las células diana, en el caso de las células T, es el serotipo 6 (AAV6). Este enfoque de edición de genoma es particularmente útil para aplicaciones terapéuticas en células difíciles de transfectar, como las células madre pluripotentes humanas [211], células madre adultas [212] y células inmunitarias primarias [197].

Recientemente se ha desarrollado una técnica de edición genómica más precisa, la edición por **PE**. Sin necesidad de crear una DSB, puede instalar cualquier sustitución, inserción y/o eliminación en un tramo de docenas de pares de bases ofreciendo una amplia variedad de aplicaciones [122]. Esta técnica minimiza la dependencia de la replicación celular y la reparación endógena del ADN, en comparación con otros enfoques basados en HDR y al realizar ediciones precisas sin crear DSBs, es posible evitar resultados de edición *off-target* [205]. Una limitación importante de la edición PE es su baja eficiencia de edición [189], aunque se está avanzando de una manera vertiginosa en este sentido y es muy posible que en el futuro sea la herramienta de elección.

### 3.3.5. MÉTODOS DE ENTREGA PARA EDICIÓN GENÓMICA

Desde la perspectiva de la biotecnología, uno de los principales desafíos en el campo de la EG es seleccionar un método que sea simple pero efectivo para **entregar las SEN y/o el ADN donador a las células huésped**. Para lograr la EG, los componentes deben ser entregados a la célula o núcleo de interés a través de métodos *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, utilizando vectores virales y no virales.

Entre los métodos virales más utilizados están los **AAV** y los **IDLVs**. Estos vectores virales pueden estar diseñados para entregar tanto la endonucleasa específica como CIRPSR/Cas9 [213] o ZFN [214], como para entregar el ADN donador, como se muestra en los trabajos [170] y [175] respectivamente. En otros casos, se combinan ambas estrategias: un vector viral para entregar la endonucleasa junto con otro vector viral para entregar el ADN donador como en el caso del trabajo de Pablo de Moço y cols. [215].

Por otro lado, en cuando a los vectores de entrega no virales, el uso de **transposones** como herramienta de vector de entrega está cogiendo un gran protagonismo en la actualidad [117] ya que . combina el beneficio de un vector viral integrativo con una expresión transgénica duradera.

Además, existen varios sistemas innovadores de transferencia basados en **nanopartículas y liposomas** para entregar los constructos CRISPR/Cas9 y maximizar su efectividad [183][185]. Esta estrategia de las NP-CRISPR tiene un gran potencial para superar las restricciones de tamaño del gen, las limitaciones de orientación de tejidos y una menor hepatotoxicidad en comparación con otros vectores. Sin embargo, todavía se está estudiando su eficacia real en células T, en modelos *in vivo* y queda por ver su aplicación en ensayos clínicos.

## 4. TERAPIAS CAR-T

En la última década, la **terapia CAR-T** ha revolucionado el ámbito de la **onco-hematología** al abordar de manera efectiva cánceres hematológicos que antes se consideraban incurables [216][217]. Aunque esta terapia adquirió notoriedad por su éxito en el tratamiento del cáncer, su base terapéutica se remonta a sus primeras etapas de desarrollo, cuando se ideó para redirigir las células T con el propósito de tratar el virus del VIH [218]. A pesar de que los primeros ensayos no lograron tratar eficazmente el VIH, sí evidenciaron la persistencia a largo plazo de las células T modificadas en pacientes inmunocomprometidos. La aplicación subsiguiente de este enfoque a las malignidades refractarias de las células B y las células plasmáticas impulsó significativamente el campo de la terapia celular adoptiva [219]. Desde entonces, se ha dedicado un esfuerzo considerable para extender este enfoque a otros tipos de cáncer [220].

Las terapias **CAR-T** se generan mediante **modificación genética de células T** previamente aisladas (generalmente del propio paciente) para que expresen el **receptor de antígeno quimérico (CAR, del inglés *Chimeric Antigen Receptor*)** en su superficie.

### 4.1. RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CAR)

Los **receptores antigénicos quiméricos (CAR)** son moléculas sintéticas que combinan regiones funcionales de diferentes receptores inmunológicos [107] diseñadas específicamente para reconocer un antígeno concreto. Los CARs se componen de:

- **Dominio de unión al antígeno:** El dominio extracelular, a menudo denominado dominio de unión al antígeno, está compuesto en la mayoría de los casos por las cadenas pesadas variables ( $V_H$ ) y ligeras variables ( $V_L$ ) de **anticuerpos monoclonales**, formando un fragmento variable de cadena única (**scFv**). Este scFv permite el reconocimiento de antígenos específicos en las superficies de las células tumorales. Por ejemplo, el scFv de todos los CARs comerciales dirigidos a CD19, Kymriah, Yescarta, Breyanzi, y Tecartus se derivan del anticuerpo monoclonal FMC63, dirigido hacia un epítipo específico de CD19 humano. Por otro lado, en lugar de anticuerpos, se exploran alternativas para el direccionamiento en la terapia CAR-T. Ejemplos incluyen el uso de **receptores, ligandos, nanoanticuerpos o péptidos** [221] [222].

- **Región de bisagra o espaciadora,** parte integral de la estructura extracelular, se conecta al dominio transmembrana y desempeña un papel crítico en la función de las células CAR. Con excepción de algunos CAR basados en la totalidad de la porción extracelular de un receptor, como NKG2D [223], la mayoría de las células CAR están diseñadas con regiones espaciadoras

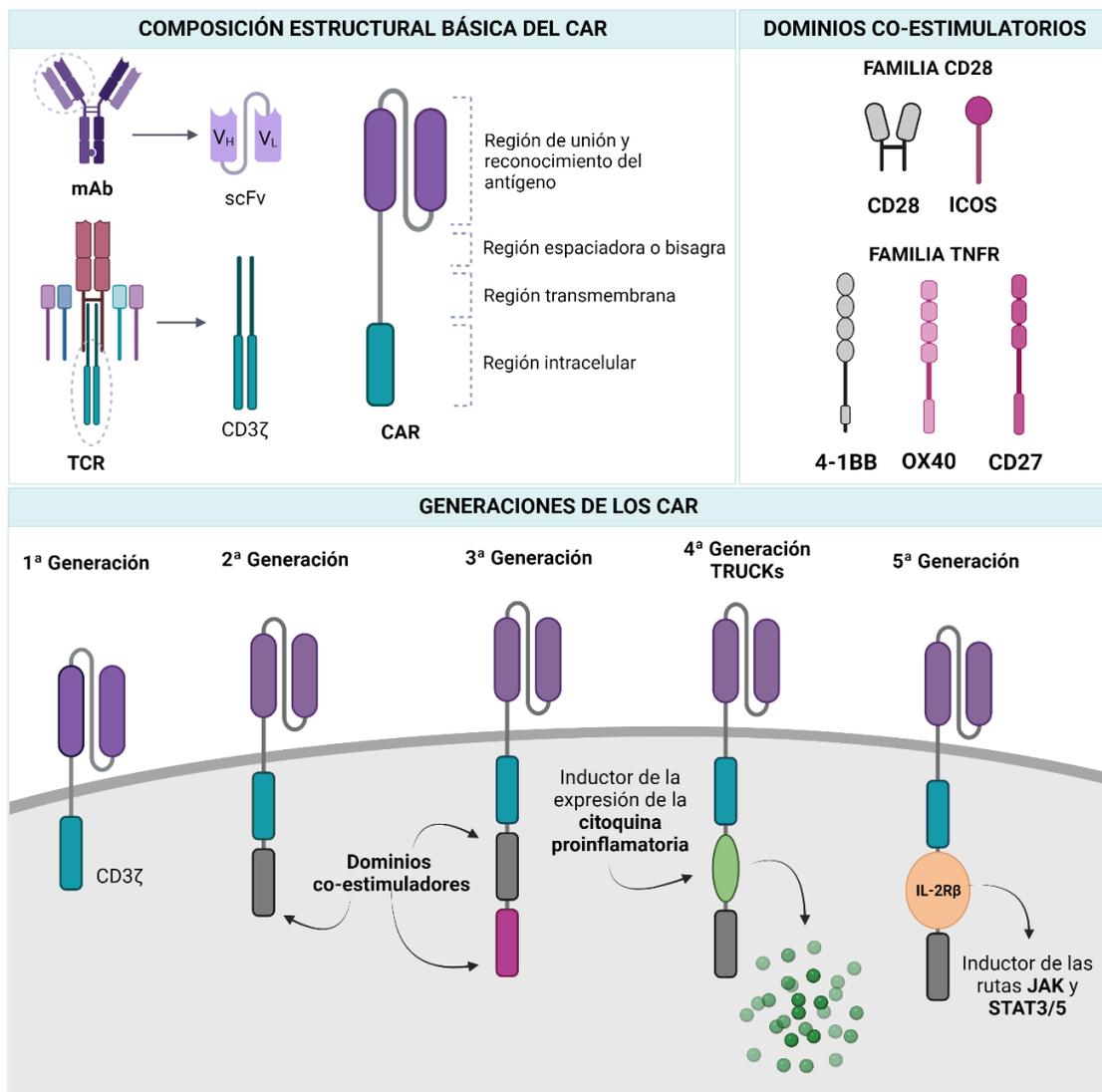
con **dominios tipo Ig**. Estos espaciadores generalmente proporcionan estabilidad para una expresión y actividad eficientes del CAR. La bisagra también brinda flexibilidad al CAR para acceder a su antígeno[110][224].

- **El dominio transmembrana** está compuesto por una hélice alfa hidrofóbica que atraviesa la membrana celular y probablemente es la región menos caracterizada del CAR. Aunque la función principal del dominio transmembrana es anclar el CAR en la membrana de la célula T, algunas evidencias sugieren que este dominio podría ser relevante para la función de las células CAR. El dominio transmembrana, derivado de moléculas como CD3- $\zeta$ , CD4, CD8 o CD28, además de anclar las moléculas CAR a las membranas de las células T, regula la señalización CAR influyendo en los niveles de expresión y estabilidad [110][224].

- **Dominios intracelulares de señalización**. Gran parte de la ingeniería de las células T CAR, se ha enfocado a estudiar y comprender los efectos de la co-estimulación del CAR con el objetivo de identificar un dominio intracelular óptimo para incluir en las construcciones del CAR. De hecho, es este dominio el que da nombre a las diferentes generaciones de CARs: 1) los **CARs de primera generación**, solo contienen la señal de estimulación proveniente de CD3 $\zeta$  y demostraron ser ineficaces en modelos tumorales relevantes; 2) **CARs de segunda generación**, además de CD3 $\zeta$ , contienen un dominio co-estimulador que proviene generalmente de CD28 o de 4-1BB, aunque se están investigando dominios de otros co-receptores T como OX40, ICOS, o CD27 o incluso dominios sintéticos. Los CARs de segunda generación, especialmente aquellos basados en CD28 y 4-1BB, han resultado especialmente eficaces debido a su capacidad para conferir una mejor persistencia a largo plazo y capacidad lítica [110][224]. Actualmente, todos los productos CAR-T aprobados comercialmente se basan en esta generación. Finalmente, 3) los **CAR de tercera generación** son aquellos que, además del dominio CD3 $\zeta$ , incorporan dos dominios coestimuladores adicionales. Pueden conferir una mayor potencia y proporcionar beneficios en términos de supervivencia, persistencia y eficacia antitumoral [110][222]. Las células CAR-T que incorporan estos CARs de tercera generación también exhiben una producción más potente de IL-2 y TNF- $\alpha$ , resultando en una actividad citotóxica mejorada en comparación con las células CAR-T de segunda generación [224] (**Figura 14**).

La mayoría de los ensayos clínicos se han realizado con CARs de segunda generación incorporando dominios intracelulares de CD28 o 4-1BB. Aunque las tasas de respuesta fueron similares, varios ensayos mostraron diferencias en la persistencia entre ambos CARs. Las células CAR-T basadas en CD28 no solían ser indetectables más allá de los 3 meses [225], mientras que las células CAR-T basadas en 4-1BB pueden persistir en los pacientes durante varios años

después del tratamiento. La señalización a través de CARs basados en CD28 resulta en una activación más rápida de las células T, proliferación, citólisis y un aumento en la glucólisis, pero con una persistencia más corta de las células T. En cambio, la señalización de 4-1BB induce una respuesta efectora más lenta de las células T y promueve la biogénesis mitocondrial, un mayor metabolismo oxidativo y una persistencia sostenida de las células T. Trabajos recientes indican que cada subtipo celular responde de manera diferente a cada dominio de co-estimulación. Por ejemplo, el dominio intracelular de ICOS mejora la persistencia de las células CAR-T CD4+, mientras que el dominio intracelular de 4-1BB ofrece una persistencia óptima en las células CAR-T CD8+ [226].



#### Figura 14. Estructura y generaciones de los CAR.

La parte superior de la figura muestra la **estructura del CAR**, El Receptor de Antígeno Quimérico, por sus siglas en inglés (*Chimeric Antigen Receptor*), una molécula diseñada para mejorar la capacidad de las células del sistema inmunológico y poder reconocer y atacar a las células cancerosas. A continuación, se presenta un resumen de la estructura básica del CAR:

1. **Dominio Extracelular:** La región extracelular del CAR está diseñada para reconocer antígenos específicos presentados en la superficie de las células cancerosas. Generalmente, este dominio se compone de fragmentos de anticuerpos. El CAR utilizado en esta Tesis está diseñado frente a **CD19**.
2. **Región bisagra:** encargada de la unión del dominio extracelular con la región transmembrana. Proporciona flexibilidad al CAR.
3. **Dominio Transmembrana:** Es la porción de la molécula que atraviesa la membrana celular, proporcionando estabilidad y anclaje al CAR en la superficie de la célula modificada.
4. **Dominio Intracelular:** Región asociada con la señalización intracelular. Contiene dominios señalizadores, como el dominio de activación CD3 $\zeta$ , que desencadenan respuestas inmunológicas una vez que el CAR ha reconocido su antígeno. También, pueden tener dominios co-estimuladores para potenciar la señalización intracelular.

La parte inferior muestra las **generaciones de los CAR**. El desarrollo de las generaciones de los receptores CAR ha mejorado significativamente la eficacia de la terapia CAR. La **primera** generación incluye sólo el dominio de activación CD3 $\zeta$ , mostrando una limitada proliferación y citotoxicidad. La **segunda** generación incorpora, además, un dominio co-estimulador, como CD28 o 4-1BB, mejorando la persistencia y la actividad antitumoral. La **tercera** generación agrega dos dominios co-estimuladores adicionales al CD3 $\zeta$ , potenciando aún más la respuesta. Posteriormente, las generaciones **cuarta** y **quinta** introducen ciertas innovaciones, como CARs que secretan citocinas proinflamatorias (**TRUCKs**) o que activan simultáneamente vías de señalización adicionales (JAK/STAT), mejorando la capacidad de reconocimiento y eliminación de tumores heterogéneos. Estas evoluciones reflejan el continuo avance en la ingeniería de CAR para optimizar la terapia contra el cáncer.

Figura creada con BioRender.com.

## 4.2. PRODUCCIÓN DE CÉLULAS CAR-T

A pesar de los diversos diseños de CAR específicos para tumores, el proceso de producción de las células CAR-T sigue unos pasos comunes en todos los casos, con diferencias en los procesos de selección de las células T y en el tiempo y modo de expansión [227]. Esto se debe a que la diversidad de las subpoblaciones de células T resulta del estímulo del microentorno y la interacción célula-antígeno. En general, la producción clínica personalizada de las células CAR-T abarca varios pasos seguidos por pruebas de control de calidad durante la producción [117]. Este proceso dura alrededor de 12 a 14 días [222].

### 4.2.1. SELECCIÓN CELULAR

El primer paso implica la recolección de linfocitos del paciente (**autólogos**) o del donante (**allogénicos**) a través de la **leucoaféresis**, donde sólo se extraen los linfocitos y el resto de los productos sanguíneos se devuelven a la circulación [226]. En el segundo paso, las **células T se aíslan, expanden y se seleccionan** en función del protocolo que se quiera seguir [228]. Por ejemplo, la combinación de los subconjuntos de células CD4 y CD8 CAR-T tiene efectos antitumorales sinérgicos *in vivo* [229]. Además, en la TCA con células CAR-T dirigidas a GD2 para el tratamiento del neuroblastoma, el número de células T CD4+ y las células T<sub>CM</sub>

(CD45RO+/CD62L+) en el producto infundido se relacionan con la persistencia de las células CAR-T [230]. Estas células aisladas se cultivan y **activan** mediante APC o de manera artificial a través de las vías  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 [231].

Para el cultivo *in vitro* de estas células, la IL-2 es el factor de crecimiento más comúnmente utilizado [110] aunque últimos estudios han demostrado que un cóctel de citocinas compuesto por IL-7 e IL-15 induce una mejor expansión y fenotipo de las células CD4 y CD8 CAR-T [224].

#### 4.2.2. GENERACIÓN DE CÉLULAS CAR

Una vez las células T están aisladas y expandidas, es el momento de llevar a cabo la adición génica (AG) mediante **transducción o transfección del CAR**. Para ello, la entrega de material genético (ARN o ADN) a las células se realiza mediante **vectores virales o no virales**, mencionado previamente en el apartado de terapia génica.

Entre los vectores virales más utilizados en la terapia CAR destacan los retrovirus y los lentivirus [117][228]. Estos vectores virales se integran en el genoma del huésped de manera "semi" aleatoria, aunque en teoría, pueden ocurrir efectos genotóxicos y mutagénicos provocados por la inserción del vector cerca de protooncogenes. Hasta donde se ha publicado, no ha ocurrido transformación maligna de células T debido a la integración de vectores lentivirales.

Aunque la modificación genética de las células T mediante **vectores virales** basados en lentivirus y retrovirus es altamente eficiente y la utilizada por excelencia, su producción es laboriosa, lenta y costosa, incluida la generación y caracterización de un banco maestro de células para la producción de virus, lo que hace que los **sistemas de transfección no virales** sean cada vez más atractivos.

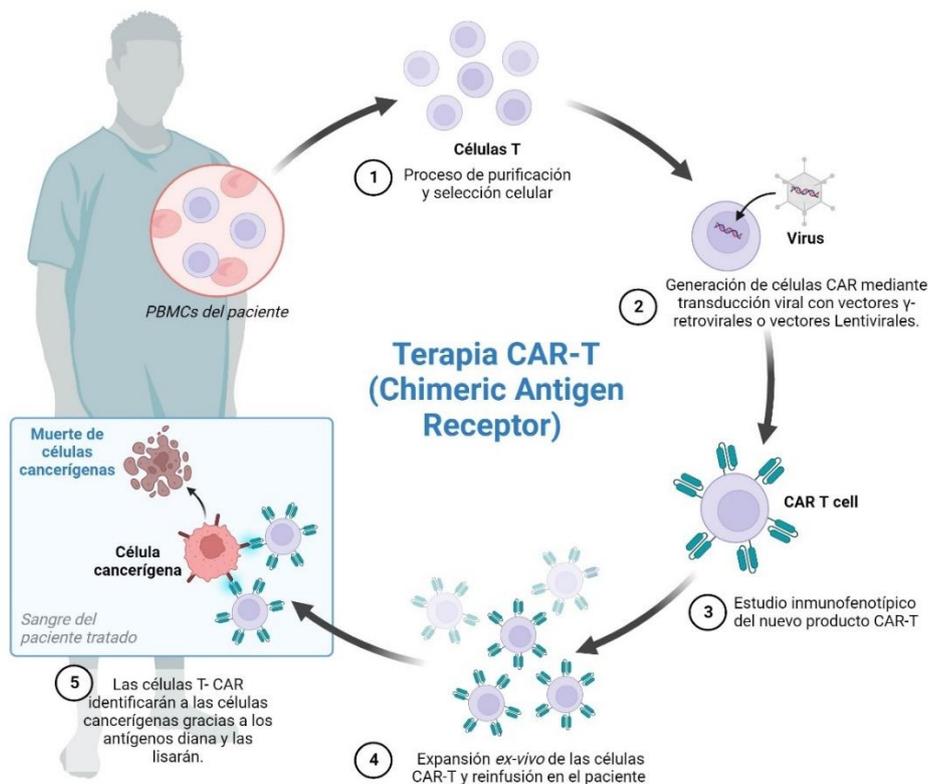
En los últimos años, se están realizando esfuerzos para obtener células CAR-T gracias a vectores no virales mediante el uso de **transposones** como son los **Sleeping Beauty (SB)** [117] y **PiggyBac**. El sistema de transposones Sleeping Beauty combina el beneficio de un vector viral integrativo con una expresión transgénica duradera. En 2014, se sugirió un protocolo optimizado (compatible con buenas prácticas de fabricación) para la producción de células CAR-T modificadas por electroporación con ARN, lo que ayuda a superar varias desventajas de la transfección viral clásica, como la contaminación viral, la baja eficiencia temporal, el mayor consumo de recursos y los efectos *off-target* [117]. Además, los vectores basados en transposones pueden transferir **elementos genéticos grandes** a la célula diana, lo que hace que

el sistema sea conveniente para co-exresar 2 o más CAR, para entregar "cargas útiles" transgénicas más grandes para la generación de TRUCKs y para otros.

Por otro lado, las inserciones mediadas por CRISPR/Cas9 se adoptan actualmente para aplicaciones clínicas de células CAR-T [222]. En esta dirección, existen nuevas estrategias para la generación de células CAR-T basadas en EG: En el caso de las terapias con células CAR-T, el uso de **AAV y CRISPR/Cas9** puede permitir la integración específica del transgén CAR en el genoma del huésped mediante la técnica del **KI** [215]. Además, el sistema CRISPR/Cas9 puede eliminar los genes endógenos en las células T, como el receptor de células T, para generar células CAR-T "universales", potencialmente más asequibles y accesibles [232][233] o para inhibir la expresión de ciertos genes no deseados.

### 4.2.3. INFUSIÓN EN EL PACIENTE

Previo a la infusión, se realiza la **expansión del producto de células CAR-T** generado, utilizando biorreactores hasta alcanzar el volumen clínicamente necesario para ser reintroducidas en el paciente como un agente terapéutico [110]. La infusión de células CAR-T en el paciente se realiza en un entorno hospitalario tras un proceso de **linfodepleción** para evitar el posible rechazo de las células CAR-T infundidas y efectos secundarios indeseados [224]



### Figura 15. Proceso clínico de la terapia CAR.

En términos generales, el proceso clínico de la terapia con **Receptores de Antígeno Quimérico (CAR)** sigue un enfoque sistemático:

1. **Aislamiento** de Células T; Se extraen células T de la sangre periférica del paciente.
2. **Modificación** Genética *ex vivo*; Mediante el uso de vectores virales, las células T aisladas son modificadas genéticamente *ex vivo* a través de un proceso de transducción. En este paso, se diseñan para expresar el CAR.
3. **Expansión** Celular y Control de Calidad; Las células T modificadas son expandidas en número y sometidas a controles de calidad para garantizar su viabilidad y funcionalidad óptimas.
4. **Reinfusión** en el Paciente; Una vez que las células T modificadas han pasado las pruebas de calidad, son reintroducidas en el paciente.

Figura creada con BioRender.com.

## 4.3. PRODUCTOS COMERCIALES TERAPIA CAR-T

Los productos CAR-T dirigidos frente a CD19 actualmente aprobados por las agencias regulatorias incluyen axicabtagene ciloleucel (**Yescarta**), tisagenlecleucel (**Kymriah**), lisocabtagene maraleucel (**Breyanzi**) y brexucabtagene autoleucel (**Tecartus**). También están aprobados los productos de células CAR-T dirigidas contra BCMA, idecabtagene vicleucel (**Abecma**) y ciltacabtagene autoleucel (**CArVYKTI**).

El CAR utilizado en esta tesis doctoral proviene gracias a una colaboración con el Dr. Manel Juan, Hospital Clinic (Barcelona), donde nos proporcionó el **CAR ARI-0001**, un receptor de antígeno quimérico de segunda generación específico para CD19. Este CAR ha sido **aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)** en el contexto de la **Exención Hospitalaria**. Esta aprobación permite su uso en el tratamiento de pacientes mayores de 25 años con leucemia linfoblástica aguda de células B en recaída o refractaria (R/R LLA-B).

Todos estos productos se generan mediante la transducción viral de **células T autólogas** (provenientes del paciente) para expresar el constructo CAR. Estos productos utilizan construcciones CAR de **segunda generación** que incluyen un dominio de unión a antígeno, dominios de bisagra y transmembrana, un dominio **co-estimulador** (derivado ya sea de CD28 o 4-1BB) y el dominio de activación de células T derivado de CD3 $\zeta$ . Los productos difieren entre sí en los dominios específicos incluidos en el CAR, el vector viral utilizado para la entrega del transgén y ciertos aspectos del proceso de fabricación. Hasta ahora, todos los productos de células CAR aprobados comparten, en diversos grados, los efectos adversos específicos de la clase, como el síndrome de liberación de citocinas (**CRS**), el síndrome de neurotoxicidad asociado a células efectoras inmunitarias (**ICANS**), la hipogammaglobulinemia y las citopenias, especialmente la aplasia de células B (toxicidad “*on target/off tumor*”).

- **Kymriah**, es un producto creado por Novartis Pharma GmbH, basado en células autólogas modificadas genéticamente que contiene linfocitos T transducidos *ex vivo* utilizando un **VL** para expresar el CAR  $\alpha$ CD19. Comprende un scFv  $\alpha$ CD19 murino vinculado a un dominio de co-estimulación intracelular de **4-1BB** humano (CD137) además de un dominio de señalización CD3 $\zeta$ . Kymriah está indicado para el tratamiento de pacientes pediátricos y adultos jóvenes de hasta 25 años con LLA de células B, pacientes adultos con DLBCL y pacientes adultos con LF, en todos los casos con enfermedad refractaria o en recaída.
- **Yescarta** (axicabtagén ciloleucel) es un medicamento creado por Kite Pharma, Inc. En este caso el vector viral utilizado para expresar el CAR  $\alpha$ CD19 de segunda generación es un **vector  $\gamma$ -retroviral**, con un dominio co-estimulador **CD28** además del dominio de señalización CD3 $\zeta$ . Yescarta está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con DLBCL y HGBL en recaída. También está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con DLBCL y linfoma mediastínico de células B grandes primario (PMBCL) en recaída o refractario. Además, está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma folicular (LF) en recaída o refractario después de tres o más líneas de terapia sistémica.
- **Tecartus** (brexucabtagén autoleucel) es un producto creado por Kite Pharma, Inc, basado en células T autólogas transducidas *ex vivo* con un vector **gamma-retroviral** que expresa un CAR  $\alpha$ CD19 de segunda generación, con un dominio co-estimulador **CD28**. Tecartus está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células del manto (LCM) en pacientes adultos mayores de 26 años con LLA de precursores de células B refractarias.
- **Breyanzi** (lisocabtagén maraleucel) es un producto creado por Juno Therapeutics Inc., basado en células CAR-T  $\alpha$ CD19 compuesto por **linfocitos T CD8+ y CD4+ purificados**, generadas *ex vivo* por separado utilizando un **VL**. En este caso el endodominio co-estimulador es el **4-1BB** y un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado no funcional (**EGFRt**) para depleccionar las células CAR-T en caso de toxicidad. Breyanzi está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con DLBCL, HGBCL, PMBCL y linfoma folicular grado 3B (FL3B), que han sufrido una recaída dentro de los 12 meses posteriores a la finalización de la quimioinmunoterapia de primera línea o son refractarios a la misma. También está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con DLBCL, PMBCL y FL3B en recaída o refractarios después de dos o más líneas de terapia sistémica.
- **Abecma** (idecabtagén vicleucel) es una inmunoterapia creada por Celgene Corporation, compuesta por linfocitos T humanos transducidos con un **VL** que codifica un CAR que reconoce el antígeno de maduración de células B (**BCMA**) y tiene como dominio co-

estimulador **4-1BB**. Está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con MM en recaída y refractario que han recibido al menos cuatro terapias previas.

- **CARVYKI** (ciltacabtagene autoleucel) es un producto celular autólogo que se basa en células T transducidas *ex vivo* mediante un **VL incompetente** que codifica para un CAR dirigido contra BCMA. Este CAR consta de dos anticuerpos de dominio único unidos a un dominio co-estimulador **4-1BB** y un dominio de señalización CD3 $\zeta$ . CARVYKI está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con MM en recaída y refractario que han recibido al menos tres tratamientos previos.

DIANA	NOMBRE	AÑO DE APROBACIÓN POR LA FDA	ENDODOMINIO	VECTOR	ENFERMEDAD	TASA DE RESPUESTA COMPLETA
	<b>tisagenlecleucel</b> <b>(Kymriah)</b>	2017	4-1BB $\zeta$	Vector Lentiviral	Leucemia linfoblástica Aguda (ALL)	81%
		2018			Linfoma B de células grandes (LBCG)	
CD19	axicabtagene ciloleucel <b>(Yescarta)</b>	2017	CD28 $\zeta$	Vector $\gamma$ -retroviral	Linfoma B de células grandes (LBCG)	86%
		2021			Linfoma folicular (FL)	
		2020			Linfoma del manto (LCM)	
	brexucabtagene autoleucel <b>(Tecartus)</b>	2021	CD28 $\zeta$	Vector $\gamma$ -retroviral	Leucemia linfoblástica Aguda (LLA-B)	68%
		lisocabtagene maraleucel <b>(Breyanzi)</b>			2021	4-1BB $\zeta$
	idecabtagene vicleucel <b>(Abecma)</b>	2021	4-1BB $\zeta$	Vector Lentiviral	Mieloma Múltiple (MM)	44%

<b>BCMA</b>	ciltacabtagene autoleucel <b>(Carvykti)</b>	2022	4-1BB $\zeta$	Vector Lentiviral	Mieloma Múltiple (MM)	73%
-------------	--	------	---------------	-------------------	-----------------------	-----

**Tabla 3. Lista de terapias CAR-T aprobadas por la FDA.**

Tabla informativa sobre las seis terapias CAR aprobadas. Se muestra la diana, el año de aprobación, el dominio coestimulador, el vector utilizado, la enfermedad indicada y la tasa de respuesta completa de los pacientes tratados.

#### 4.4. LIMITACIONES DE LA TERAPIA CAR DEBIDO A LA EVASIÓN TUMORAL

La terapia con células T ha sido una de las herramientas más revolucionarias en el tratamiento del cáncer; sin embargo, las toxicidades asociadas han limitado las aplicaciones de este enfoque. Hasta la fecha, la caracterización de las toxicidades proinflamatorias asociadas a la terapia CAR aprobadas por la FDA se ha estudiado ampliamente [234].

Varios factores determinan la aparición e intensidad del **CRS** o del **ICANS**, incluyendo el tipo de tumor, el objetivo específico y el diseño de CAR [235] además de varios desafíos relacionados con la **inmunosupresión creada en el TME**, el escape tumoral debido a la **ausencia de antígeno** por parte de las células diana o la **inmunosupresión** inducida por el mismo. Además, la **toxicidad** derivada de la terapia debido al fenómeno “**on target/off tumor**” también limita el éxito terapéutico.

A continuación, se detallan brevemente estos mecanismos de evasión tumoral ligados a la terapia CAR:

- **CRS/ICANS.** Las complicaciones comunes asociadas al uso de células CAR-T incluyen el **CRS** [236] y el **ICANS** [237][238]. Una de las causas de estas complicaciones se debe a los mecanismos efectoras de las propias células CAR-T, quienes después de unirse al antígeno diana y activarse, liberan **citocinas proinflamatorias** (IL-6, IL-2, -IL-2 $\alpha$ , IL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$ ); factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (**GM-CSF**); proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$ , (**MIP-1 $\alpha$** ); proteína quimiotáctica de monocitos 1, (**MCP-1**) [117][239]. Estos factores secretados contribuyen al reclutamiento y activación de más células del SI intensificando la respuesta inmunitaria antitumoral, pero a su vez causa los síntomas clínicos del CRS: una respuesta inflamatoria sistémica incontrolada, con *shock* circulatorio que requiere vasopresores, fuga vascular, coágulos vasculares diseminados, taquicardia, hipotensión, hipoxia y disfunción del sistema de múltiples órganos [240].

Aunque la patogénesis de la ICANS no se comprende completamente, se cree que la concentración elevada de citocinas también es responsable del aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a la inflamación facilitada por las células CAR-T, causando la activación endotelial y la interrupción de la barrera hematoencefálica, con fugas hacia el sistema nervioso central. Estos efectos en conjunto derivan en síntomas de neurotoxicidad [107][239][241]. La manifestación de ICANS comienza con encefalopatía tóxica, afasia, disfasia, función motora deteriorada y somnolencia. ICANS también es reversible en pacientes que no desarrollan déficits neurológicos permanentes [240].

- **ESCAPE ANTIGÉNICO.** Una de las limitaciones más habituales de la terapia con células CAR-T es el desarrollo de **resistencia tumoral** a los CAR-T dirigidos frente a un solo antígeno. Aunque estas CAR-T pueden ofrecer tasas de respuesta elevadas inicialmente, las células malignas por una parte significativa de los pacientes tratados con esta terapia muestran **pérdida parcial o completa** de la expresión del antígeno diana [234]. Este fenómeno de **edición inmunitaria** se conoce también como **escape antigénico**. Por ejemplo, aunque el 70-90% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda en recaída y/o refractarios muestran respuestas duraderas a la terapia con células CAR-T dirigidas a CD19, datos de seguimiento recientes sugieren el desarrollo de un mecanismo común de resistencia, que incluye la regulación a la baja/pérdida del antígeno CD19 en el 30-70% de los pacientes que tienen enfermedad recurrente después del tratamiento [117]. De manera similar, se ha observado la regulación a la baja o pérdida de la expresión de BCMA en pacientes con MM tratados con células CAR-T dirigidas a BCMA [242]. Patrones similares de resistencia por escape antigénico se han observado en tumores sólidos, como es el caso de los CAR-T dirigidas a IL13Ra2 en glioblastoma que muestran recurrencias tumorales tras la disminución en la expresión de IL13Ra2 [243].
- **TOXICIDAD ON TARGET/OFF TUMOR Y BAJA ESPECIFICIDAD.** El fenómeno "**on-target off-tumor**" se debe a que los tejidos sanos también expresan el mismo antígeno al que está dirigido el CAR, aunque en niveles variables, lo que lleva a efectos tóxicos perjudiciales[231][244] que conducen a síntomas similares a enfermedades autoinmunes. Sin embargo, la aplasia de células B en la terapia con células CAR-T suele ser bien tolerada. Para superar este obstáculo, se han estudiado diferentes tipos de CAR con afinidad ajustable para reconocer las células tumorales que tienen una mayor densidad de antígenos en la superficie y evitar la interacción con los tejidos normales que expresan antígenos de baja densidad [245].

- **AMBIENTE INMUNOSUPRESOR.** En el microambiente tumoral, varias células infiltradas en el tumor contribuyen a la inmunosupresión, incluidas las células **MDSC**, las células **Tregs** y los **TAM** [246]. Estos infiltrados y las células tumorales contribuyen a la producción de factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas que respaldan el crecimiento tumoral además de una reducción de la inmunovigilancia. Una de las características más comunes es la sobreexpresión de **RI**, conduciendo a la activación de vías inhibitorias intrínsecas de las células CAR-T. La modulación de las respuestas del TME, antagonizando los reguladores inmunológicos negativos asociados al tumor como los puntos de control inmunológico (ICB), es una estrategia muy común en la actualidad. Estos puntos de control desempeñan un papel fundamental en las interacciones tumor-célula T, lo que lleva al **agotamiento, tolerancia** y, en última instancia, **disfunción** de las células T [247].

**PD-1, TGF- $\beta$ , CTLA-4** o **PD-L1**, entre muchos otros, se reconocen como dianas terapéuticas altamente prometedoras. Por un lado, la interrupción de CTLA-4 con CRISPR/Cas9 aumenta la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , lo que conduce a un aumento significativo en la apoptosis de células tumorales de adenocarcinoma humano y carcinoma de vejiga [248]. Por otro lado, uno de los RI de células T más ampliamente caracterizados es PD-1. Su activación depende de los ligandos PD-L1 y PD-L2 presentes en las células tumorales, cuya interacción con PD-1 inhibe la activación y proliferación de las células T al inducir la anergia y un proceso inmunosupresor en consonancia con el TME [249]. En consecuencia, la combinación de células CAR-T con inmunoterapia y bloqueo de estos puntos de control se considera el **próximo enfoque de inmunoterapia de vanguardia**. Este enfoque proporciona una mejor penetración tumoral y además del bloqueo de PD-1/PDL1, garantizando una función sostenida y persistente de las células T [106][250]. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 aprobados por la FDA ya mencionados anteriormente en la tabla 1 o la edición del gen PD-1, puede aumentar la potencia de las CAR-T[122].

Finalmente, el **TGF- $\beta$**  (tipos 1, 2 y 3) es secretado por células estromales del TME y es una de las **moléculas inmunosupresoras más importantes** en el mismo contribuyendo a la iniciación y progresión del cáncer. La presencia de TGF- $\beta$ 1 acelera el agotamiento de las células CAR-T al aumentar la expresión de PD-1 e inducir el fenotipo similar a Treg dependiente de FOXP3 de las células CAR-T [251]. Recientemente, se están evaluando células CAR-T más resistentes a los factores inmunosupresores del microambiente tumoral, como las señales inhibitorias mediadas por TGF- $\beta$  [252].

- **INFILTRACIÓN TUMORAL.** En comparación con los CAR-T hematológicas, la terapia con células CAR-T en tumores sólidos se ve limitada por la capacidad reducida de las células CAR-

T para llegar e infiltrarse en los tumores sólidos, ya que el microambiente inmunosupresor del tumor y las barreras físicas del tumor, como el estroma tumoral, limitan la **penetración y movilidad de las células CAR-T**.

## 4.5. NUEVAS ESTRATEGIAS CAR

A lo largo de los últimos años se han ido desarrollando nuevas estrategias dirigidas a la terapia CAR para poder hacer frente a los problemas y limitaciones mencionados anteriormente. Las nuevas adaptaciones al TME, siendo el objeto principal de estudio, se basan en estrategias de **terapia génica** como: **AG**; donde se estudian nuevos CARs o nuevas combinaciones de CARs para potenciar la terapia, y/o **EG**; donde los principales esfuerzos se centran en la evasión de expresión de RI. Finalmente, existen **terapias combinacionales** donde, además de la terapia CAR, se utilizan anticuerpos monoclonales o EG de estas CAR-T.

Uno de los principales enfoques se basa en el **diseño** del propio CAR. Modificaciones en la región espaciadora o bisagra y en la región transmembrana para controlar los niveles de secreción de citocinas y mantenerlos dentro de la ventana terapéutica, como en el trabajo de Ying y cols. [253]. Además, se han estudiado diseños centrados en los sus niveles de expresión, regulando la expresión del CAR bajo adición de doxiciclina [254], bajo expresión de distintos promotores para simular la expresión endógena del TCR [255] o directamente bajo el promotor endógeno del TCR [256]. De esta manera también se consigue el KO del TCR y se puede evitar EICH (Enfermedad de Injerto Contra Huésped).

A continuación, se describirán brevemente las nuevas estrategias más destacadas hasta ahora (**Figura 16**).

### 4.5.1. ADICIÓN GÉNICA

Además de su modificación en los dominios intracelulares, la ingeniería de los CAR ha seguido avanzando hasta consolidar las generaciones cuarta y quinta, mejorando la eficacia de la terapia mediante nuevos enfoques:

#### 4.5.1.1. TRUCKS O CAR-T DE 4TA GENERACIÓN

Las "células T redirigidas para la destrucción mediada por citocinas universales" o **TRUCKs**, representan la "**cuarta generación**" de células CAR-T (**Figuras 15 y 16**). Estas células combinan la especificidad antigénica de las células CAR-T con la **liberación localizada y controlada de citocinas proinflamatorias** a través de varios mecanismos sinérgicos como la

exocitosis (perforina, granzima) o a través de Fas–FasL (TRAIL), diseñadas para atraer células inmunitarias específicas y suprimir otros tipos celulares, evitando así la toxicidad sistémica [136][257][258]. Los TRUCKs tienen una capacidad lítica mejorada de los tumores heterogéneos que han escapado al reconocimiento de las células CAR-T debido a la **regulación antigénica**. Pueden ser eliminados posteriormente mediante la activación de los TIL, con el respaldo de las células inmunes innatas [259]. Las citocinas también estimulan el **crecimiento, supervivencia y expansión de las células T**, proporcionando resistencia a la inmunosupresión y mejorando la eficacia antitumoral al promover la eliminación de células tumorales no reconocidas previamente. Las citocinas empleadas en los TRUCKs hasta ahora incluyen IL-8 [260], IL-9 [261], IL-11 [262], IL-12 [263], IL-15 [264], IL-21 [265], e IL-18 [136]. Varios ensayos clínicos evalúan la combinación de la terapia con células CAR T con citocinas como IL-2, IL-7, e IL-15, mostrando mayor persistencia y remisiones duraderas en diversas neoplasias, aunque se destaca la necesidad de evaluar enfoques combinados para optimizar la actividad antitumoral (NCT00924326, NCT00019136, NCT04119024, NCT03098355, NCT02652910, NCT04186520, NCT03929107, NCT02992834).

Existen diversas estrategias para expresar citocinas en células CAR-T. La **expresión inducible** de citocinas tras la activación del CAR, bajo el control del promotor NFAT6-IL-2, o con casetes de liberación constitutiva, proporciona mayores niveles de citocinas, pero puede generar **toxicidad** y efectos adversos. La estrategia más prometedora es permitir la **expresión regulable de citocinas**, favoreciendo la respuesta inmunitaria focalizada del paciente [234]. Citocinas como **IL-12, IL-18 e IL-15** se exploran para mejorar la respuesta inmune, reclutar células inmunitarias innatas y contrarrestar la inmunosupresión, actuando en sinergia con las células CAR-T para una mayor actividad antitumoral [123][222].

- El uso de **IL-18**, se ha mostrado eficaz en modelos preclínicos ya que su expresión inducible mejora la **proliferación** y la **actividad antitumoral de monocitos y linfocitos**, polarizando las células CAR-T hacia un fenotipo efector. El uso de TRUCKs IL-18 promueve la inmunidad innata, aumenta el número de macrófagos M1 y células NK, y reduce células T reguladoras y dendríticas supresoras en el TME, mejorando la eficacia antitumoral [78][123].
- La expresión de **IL-15** en las células TRUCK IL-15 es prometedora para prolongar la **supervivencia celular** y mejorar la **eficacia antitumoral** [266][267]. Las CAR-T expandidas en presencia de IL-15 conservan un fenotipo memoria de células madre menos diferenciado (**T<sub>scm</sub>**) demostrando **propiedades anti-apoptóticas**, un **menor agotamiento** y **mayor**

**capacidad proliferativa** ante el tumor [267][103][268]. Este enfoque se ha utilizado para mejorar la citotoxicidad en diversos tumores, como el mieloma [269], cáncer de mama [270], y carcinoma colorrectal [271]. Además, las células CAR-T/IL-15 muestran una actividad reducida de mTORC1, **disminución en la expresión de enzimas glucolíticas** y mejora en la aptitud mitocondrial, indicando un metabolismo definido por **OSPHOS/FAO** [267]. Además, se ha visto que la aplicación de IL-15 durante la terapia con CAR-T beneficia a diversos objetivos, como VEGFR-2 [272], Her-2 [268], glicoproteína-3 [265], entre otros.

Es por esto, que esta tesis doctoral se basará en el uso de TRUCKs expresando IL-15 de manera inducible

ENSAYO	AGENTE	DESCRIPCIÓN	ENFERMEDAD	COMBINACIÓN	FASE
<b>NCT04377932</b>	Células TRUCK GPC3-CAR IL-15	Células T GPC3-CAR TRUCK	Cáncer de hígado; RMS;		1
<b>NCT05103631</b>		con IL-15	Tumor rabdoide Maligno;  liposarcoma; Tumor de Wilms;  Tumor del saco vitelino		1
<b>NCT04715191</b>	<b>Células T GPC3- CAR IL-15 y</b>  Células T TRUCK IL-21	CAR TRUCK  con IL-15 e IL-21	Cáncer de hígado;  Tumor rabdoide Maligno;  liposarcoma;  Tumor de Wilms;  Tumor del saco vitelino		1
<b>NCT04093648</b>	Células GPC3- CAR IL-15 y  T TRUCK IL- 15/IL-21  (TEGAR)	Estudio de seguridad y dosificación de  Células T GPC3-CAR  Co-expresando IL-15 o ambos  IL-15 e IL-21	Carcinoma hepatocelular  Hepatoblastoma	Citoxano  Fludara	1
<b>NCT04844086</b>	Células CAR  T anti	Estudio de RPM células T CAR  CD19 mbIL-15	B-LLA R/R;  LNH; PMBCL; LBDCG; FL;		1

	CD19-mbIL15		LCM; Linfoma de células B		
<b>NCT05110742</b>	Células NK CD5 CAR IL-15	Estudio de posología y eficacia. células NK derivadas de la sangre del cordón umbilical CAR5/IL-15	Neoplasias malignas de células T; LCM LLC	Fosfato de fludarabina Ciclofosfamida	1/2
<b>NCT05092451</b>	células NK CAR.70/IL-15	Estudio de posología y eficacia. para CAR7.0/IL-15 en células NK derivadas de la sangre del cordón umbilical	linfoma de células B; linfoma miedode agudo Síndromes mielodisplásicos (SMD)	Ciclofosfamida Fosfato de fludarabina	1/2
<b>NCT03774654</b>	células NKT CD19-CAR (ANCHOR)	Seguridad, eficacia y dosis. estudio de escalada de alogénicos Células CD19 CAR NKT co-expresando IL-15 (ANCLAJE)	LNH refractario; Linfoma linfocítico de células B pequeñas refractario; B-LLA R; LLC R; LNH R		1
<b>NCT02652910</b>	Células T CD19- CAR TRUCK IL-7/IL-15	Estudio de Eficacia y persistencia de las células T CD19-CAR TRUCK IL-7/IL-15	LF R; LCM R; LBDCG en adultos en estadio III y IV		1/2
<b>NCT05526638</b>	CAR-T-IL-15/IL-15R $\alpha$	Células CAR-T específicas de CD19 construidas que sobreexpresan IL-15 y el receptor alfa de IL-15 (IL-15Ra). IL-15 mejora la persistencia de las células T y IL-15Ra reduce la efectos adversos de la IL-15.			

NCT05110742	CAR 5/IL15 en células transducidas CB-NK	Células NK transducidas con IL15 diseñadas con CAR CD5	tratamiento de pacientes con neoplasias malignas hematológicas R/R	1/2
[273]	Células T CAR de sushi CD4-IL15/IL15	CD4 CAR modificado para secretar un complejo IL-15/IL-15sushi Efecto antineoplásicos de células T in vitro, in vivo y en fase	Leucemia-linfoma agresivo de células T	
[274]	Células T mbIL15-CAR	CAR coexpresa una IL-15 quimérica unida a membrana (mbIL15)	Leucemia CD19+	
[275]	161533 TriKE	Enganchador asesino trispecífico que contiene scFv monocatenario contra CD16 y CD33 y un reticulante de IL-15 humano modificado	Se restauró la potente función NK contra la leucemia mieloide aguda primaria.	

**Tabla 4. Listado de ensayos en los que se utiliza la combinación de IL-15 con la terapia CAR.**

Tabla resumen sobre los últimos **ensayos en inmunoterapia y cáncer combinando el uso de la interleucina 15 y la terapia CAR**. Abreviaturas: Linfoma no Hodgking LNH), Linfoma mieloide agudo (LMA), Leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), Linfoma del manto (LCM), Linfoma difuso de células grandes (LBDCG), Linfoma de células B (B-LLA).

#### 4.5.1.2. OTRAS ESTRATEGIAS

- **Los CARs de quinta generación** o también llamada “nueva generación CAR” forman parte de un campo que está siendo actualmente explorado. Su diseño también está basado principalmente en la **segunda generación de los CAR**. Incluye el receptor citoplasmático de la IL-2 truncada y un dominio de la cadena beta (IL-2R $\beta$ ) junto con el motivo de unión al factor de transcripción STAT3/5 para potenciar la ruta JAK/STAT [107]. De esta manera, el reconocimiento específico del antígeno por este receptor CAR desencadena simultáneamente la señalización del TCR (a través de los dominios CD3 $\zeta$ ), la co-estimulación (dominio co-estimulador adicional) y la señalización de citocinas (JAK–STAT3/5),

proporcionando de una manera efectiva estas tres señales de manera sinérgica para impulsar la activación completa y proliferación de las células T.

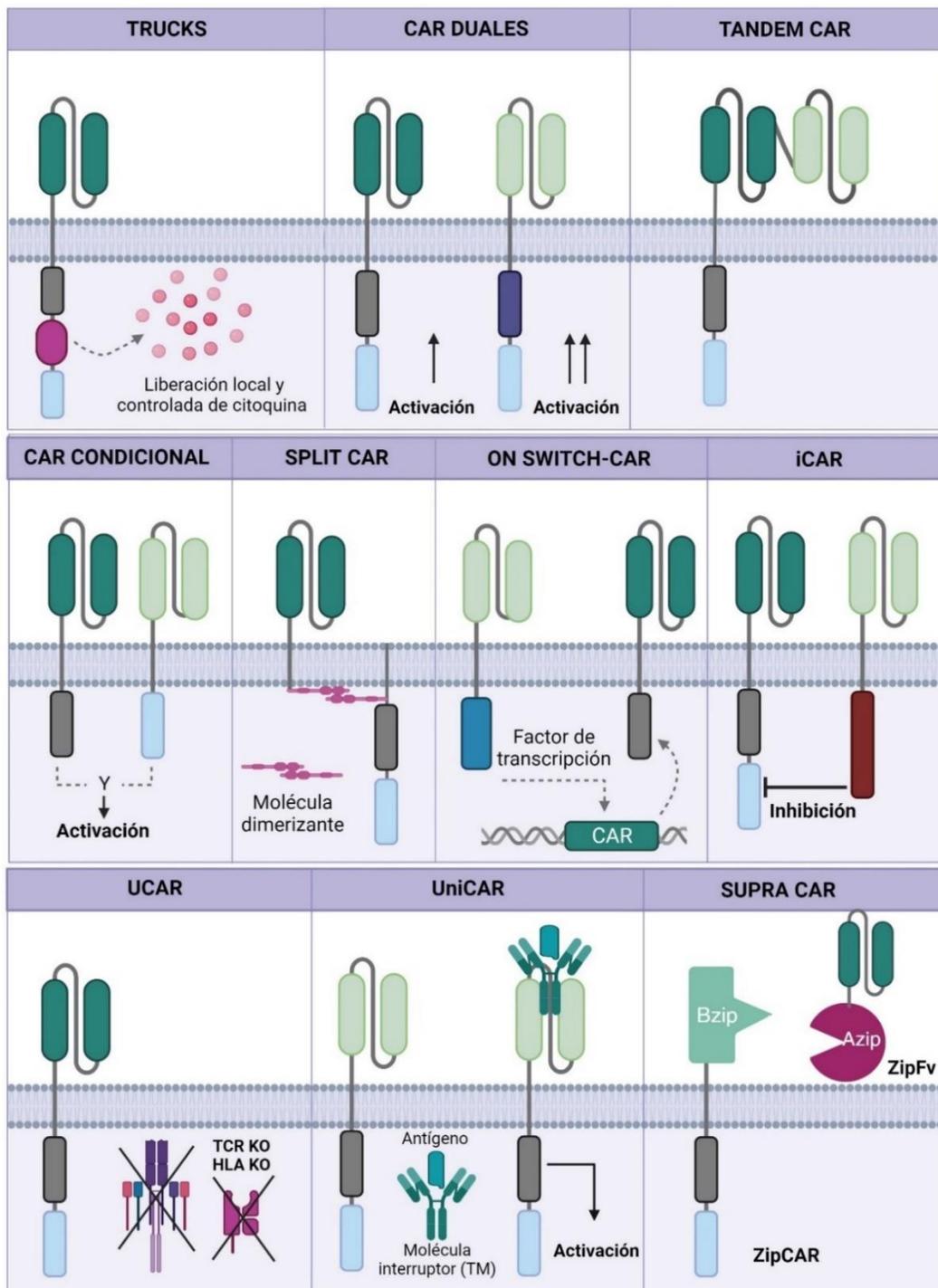
- **Células CAR-T DUALES.** Dada la expresión heterogénea y la pérdida de **antígenos** en los tumores, se ha planteado la hipótesis de que la **combinación de dos antígenos asociados al tumor** podría mejorar la actividad antitumoral de las células CAR-T [276]. En las células **CAR duales**, las células T co-expresan dos tipos independientes de CAR, cada uno específico para **un antígeno diferente** [277]. Este enfoque ha demostrado una fuerte eficacia en modelos preclínicos [123]. Algunos enfoques frente a ALL combinan los antígenos CD19, CD22 y CD123 [278] y frente a Linfoma [279] usan CAR duales diseñados frente a CD19 y CD22 otros, frente a MM usan CAR duales  $\alpha$ CD38/CD138 [280]. Su relevancia clínica se está investigando actualmente en 22 ensayos clínicos (incluidos, por ejemplo, NCT06084286, NCT04303247, NCT05858684, NCT05225831).
- **TANDEM CAR O CAR BIESPECÍFICOS.** Los Tándem CAR (**TanCAR-T**) están diseñados para reducir la limitación antigénica. Este tipo de CARs posee **dos dominios de unión**, dirigidos a **dos antígenos diferentes** en la región extracelular, pero compartiendo **una única región intracelular** [281][282][239]. Se han desarrollado CAR contra CD19 y CD22 para ALL y linfomas, y contra HER2 y CD19 para linfoma y cáncer de mama, entre otros ejemplos [254]. A pesar de su potencial, los CAR tándem enfrentan desafíos en la optimización de la longitud del espaciador y la secuencia del enlace entre los dos scFv, así como la orientación de los scFv para garantizar un reconocimiento óptimo del antígeno y una activación completa de las células T [283].
- **CAR CONDICIONALES.** Esta estrategia combina **CARs de diferentes especificidades** permitiendo el reconocimiento de un patrón de antígenos y una activación modulada de las células CAR-T. En este caso, se co-expresan **dos CARs distintos**, siendo un CAR el que proporciona la señal primaria **CD3 $\zeta$**  y el otro CAR la señal **co-estimuladora** CD28 [284]. En consecuencia, se requiere simultáneamente la **activación de ambos antígenos** y, por lo tanto, la señalización a través de ambas cadenas de señalización para inducir la **activación completa** de las células T. En este enfoque de señal dividida, el reconocimiento de un solo antígeno conduce a una activación subóptima de las células T y una eliminación limitada de las células normales evitando así el efecto "*on target/off tumor*". Por tanto, utilizando este enfoque, las células CAR-T lograrán su activación completa frente a los tumores, donde ambos antígenos pueden estar expresados [285][286].

- **SPLIT-CAR.** Los **Split-CAR** están diseñados como **receptores CAR fragmentados**, donde el módulo de unión a antígenos extracelular está dissociado de los componentes de señalización intracelular [123][231][286]. El ensamblaje de estos dos receptores ocurre sólo en presencia de una molécula pequeña **heterodimerizante** conduciendo finalmente a la **activación** de las células CAR-T. La magnitud de las respuestas depende de la dosis del medicamento o molécula heterodimerizante, lo que permite establecer un **control sobre el tratamiento**.
- **CAR "ON-Switch".** Estos CAR se basan en una estrategia que utiliza la clave "**encender/apagar**" para controlar la respuesta de las células CAR-T. Los CAR "ON-switch" requieren de la expresión de otra molécula para ser activados o expresados. Un ejemplo es el diseño CAR basado en MyD88/CD40 inducible (iMC) para proporcionar el interruptor de activación mediante la administración del fármaco rimiducid que une los 2 dominios de señalización necesarios para la activación de las células T. Una estrategia más reciente implica un sistema de reconocimiento en el cual la activación de un receptor (Notch sintético) induce la expresión de un segundo receptor (CAR) que induce la activación final de las células T después del reconocimiento del antígeno (synNotch) [287][288]. Estas células T con synNotch CAR se han dirigido contra GFP, HER2/neu, CD19 y EGFRvIII [254]. Sin embargo, la evasión del tumor de las células CAR-T a través de la pérdida del primer antígeno dirigido por el receptor Notch sintético es una limitación importante de esta estrategia [287][288].
- **CAR INHIBIDORES (i-CAR).** En la aplicación opuesta a los CAR duales, se han desarrollado los CAR inhibidores (**iCAR**) coexpresados con **señales inhibitorias** en lugar de señales activadoras para así **bloquear la activación de las células CAR-T**, por ejemplo, al interactuar con antígenos en células sanas [289][290]. Estos iCAR llevan el dominio de señalización de un receptor **inmunoinhibitorio** (por ejemplo, CTLA-4 o PD-1). Uno de los desafíos de este enfoque es la identificación de antígenos de superficie celular que se expresan en células normales, pero están ausentes en las células tumorales, problema complementario al obstáculo de identificar antígenos específicos del tumor ausentes en los tejidos normales [280][291].
- **CAR UNIVERSALES, uni-CAR.** Una estrategia diferente que podría abordar simultáneamente la **evasión del antígeno, mitigar las toxicidades, agilizar el proceso previo a la terapia y los costos** son los llamados CAR universales (**uni-CAR**) haciendo que la función de las células CAR dependa de la provisión de sustancias adicionales como anticuerpos o sus derivados. En lugar de ingenierizar células T con especificidades de antígenos fijas, estas terapias CAR están compuestas por dos partes: (1) una molécula basada en anticuerpos que **reconoce un**

**antígeno** tumoral, modificada para expresar un "**interruptor**" (TM); y (2) una célula **CAR-T universal sin especificidad tumoral** por sí misma, que contiene un constructo con una porción extracelular que **se une al interruptor** y vinculada a los **dominios de señalización intracelular** [231]. Las células UniCAR presentan una ventaja sobre las células CAR, pudiendo dirigir las **mismas células a diferentes antígenos tumorales** modificando tan sólo el módulo diana [292].

Se está realizando un ensayo clínico usando estos CAR activados con FITC para sarcoma osteogénico (NCT05312411).

- **SUPRA CAR.** Para mejorar la controlabilidad de las células uni-CAR, se crearon células con un sistema de CAR divididos, universales y programables (**SUPRA CAR**). Consta de dos partes: (1) un **receptor universal** con un adaptador de cremallera de leucina extracelular (**zipCAR**), expresado en las células y, a parte, (2) un dominio scFv fusionado a una segunda cremallera de leucina (**zipFv**) [293] dirigido **frente el antígeno objetivo**.
- Estos sistemas versátiles permiten a los investigadores combinar fácilmente las células zip-CAR-T (uni-CAR) con zipFv, dirigiendo estas células frente a diferentes antígenos para evitar la evasión tumoral. En el caso de las células SUPRA CAR, la activación de las células puede modularse cuando sea necesario mediante la adición de un zipFv competitivo que puede unirse con alta afinidad al zipFv con especificidad tumoral o sus funciones efectoras pueden modularse cambiando la configuración del bloqueo de la cremallera de leucina [294].



**Figura 16. Nuevas estrategias CAR más destacadas.**

Además de las estrategias dirigidas a los **TRUCKs**, las terapias CAR-T con **puertas booleanas** buscan mejorar la selectividad y seguridad de estas terapias mediante el control preciso de la activación de las células CAR-T. Inspiradas en la lógica booleana, estas puertas incluyen estrategias como:

1. Puerta "Y", que utiliza CAR **duales** o los **TandemCAR** para destruir células que expresan dos antígenos simultáneamente
2. Puerta "NO", que utiliza CAR **dual** con señales de activación e inhibición para limitar la respuesta inmunológica en presencia de ambos antígenos, como los **iCAR**.
3. Puerta "O"/"SI", que permite la expresión del CAR solo en condiciones deseadas, ajustando la terapia según las necesidades del paciente o del entorno como por ejemplo los CAR **condicionales**, **Split-CAR**, **ON-Switch CAR**, **UniCAR** o **SUPRA CAR**.

Imagen creada con BioRender.com

#### 4.5.2. EDICIÓN GENÓMICA

Además de los enfoques basados en la AG, otro enfoque hacia nuevas terapias CAR se centra en la **EG**, gracias al uso de las **nucleasas específicas** mencionadas en el primer apartado de esta tesis doctoral para poder evitar la expresión de ciertas moléculas inhibitorias y así suplir ciertas carencias en cuanto a las limitaciones de evasión tumoral.

Se ha demostrado que la interrupción de la señalización de los puntos de control inmunológico mediada por endonucleasas, **mejora la eficacia terapéutica** de las células CAR-T en el entorno tumoral inmunosupresor. Con este enfoque, se han creado células CAR-T resistentes a puntos de control inmunológico utilizando un sistema CRISPR multiplexado desactivando el **TCR, HLA clase I, PD-1 y CTLA-4** [248][295][296]. En el trabajo de C. Zhang y cols., se consiguió una reducción significativa de la expresión superficial de PD-1 en las células T, sin efectos adversos que afecten la funcionalidad o el fenotipo de estas células editadas mediante la electroporación de ARNm que codifica para **ZFNs** [297]. Además, se han explorado otras aproximaciones basadas en las tecnologías **TALEN** y **CRISPR/Cas9** para inactivar el gen *PDCD1* en células T CD8+ a través de un protocolo de electroporación [298]. De las herramientas de edición genómica descritas en este trabajo, se han utilizado TALEN, CRISPR-Cas9 y ABE para editar los loci de *PDCD1* [122]. En todos los casos, la interrupción de esta proteína mejora las respuestas inmunológicas celulares, aumentando la citotoxicidad frente al cáncer y mejorando la inmunoterapia del tratamiento. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos con células T autólogas con la eliminación de PD-1 para el tratamiento de cánceres como el cáncer de próstata (NCT02867345), cáncer de vejiga (NCT02863913) y carcinoma de células renales (NCT02867332). Otros ensayos clínicos se reducen la expresión de PD-1 para combatir el cáncer de pulmón (NCT02793856), cáncer de esófago (NCT03081715, fase II) y múltiples tumores (NCT03545815, NCT03747965, NCT03399448) están en curso.

En cuanto a las mejoras en terapia CAR mediante EG centrados en la plataforma TALEN, existen estudios centrados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) con UCART123, células T universales generadas a partir de donantes sanos (NCT04106076), en pacientes refractarios de LMA con UCART dirigidas contra CD123 (NCT03190278), en la evaluación de la seguridad y eficacia de UCART dirigidas contra CS1 en pacientes refractarios de MM (NCT04142619), en el uso de UCART22 en pacientes refractarios de leucemia linfoblástica aguda CD22+ (NCT04150497, BALLI-01), y en la evaluación del uso de UCART20x22 en linfoma no Hodgkin de células B (NCT05607420, NatHaLi-01).

En cuanto al eje PD-1/PD-L1, otros enfoques se basan en el KO de PD-1 en TILs [299][300], o en CTLs favoreciendo la supervivencia y la capacidad lítica celular [135]. En el caso de la leucemia linfoblástica, se vio que la combinación de la terapia CAR junto con el KO de PD-1 incrementaba la capacidad lítica de las células T [301]. En el caso de MM, Zhao y cols. consiguieron editar el locus de PD-1 demostrando una mayor apoptosis en las células diana mediante una mayor expresión de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [298].

La aplicación de la edición de PD-1 con La tecnología CRISPR en células CAR-T se ha implementado progresivamente en ensayos clínicos, como son los ensayos en fase I para tumores sólidos positivos para mesotelina (NCT03545815), mieloma múltiple (NCT03399448), cáncer de esófago (NCT03081715), cáncer de pulmón no microcítico metastásico (NCT02793856), malignidades avanzadas en estadio EBV (virus de Epstein-Barr) positivas (NCT03044743), carcinoma hepatocelular avanzado (NCT04417764) y TILs /CAR-TILs para tratar tumores sólidos avanzados (NCT04842812).

Actualmente, hay **diez ensayos clínicos que emplean la plataforma CRISPR/Cas9 para la EG de células T en terapias celulares**, cuatro para tumores sólidos y seis para tumores hematológicos. Los ensayos en tumores sólidos (NCT03545815, NCT03747965, NCT04438083, NCT05795595) se centran en estrategias como la **eliminación dual de PD-1 y TCR en células CAR-T** y la evaluación de células T editadas en CRR y su eficacia en tumores sólidos refractarios como carcinoma cervical, renal, esofágico, pleural y pancreático. En tumores hematológicos (NCT04502446, NCT04035434, NCT03398967, NCT03166878, NCT05643742, NCT04244656), se investiga la seguridad y eficacia de células T editadas para PD-1



## HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

---

La evolución de la terapia adoptiva de linfocitos T expresando receptores antigénicos quiméricos (**CAR**) ha transformado la perspectiva de utilizar el sistema inmunológico como una herramienta terapéutica contra el cáncer. Este enfoque emergente se ha destacado, especialmente en el **tratamiento de neoplasias hematológicas**, donde las células T modificadas con receptores quiméricos específicos para antígenos tumorales (células CAR-T), dirigidas **contra CD19**, han demostrado una **eficacia excepcional en leucemias y linfomas refractarios**. La aprobación de cinco productos CAR-T por la **FDA/EMA** valida la prometedora actividad terapéutica de esta estrategia, incluyendo la aprobación en España de la terapia con células CAR-T expresando el **CAR ARI-0001**. Sin embargo, los beneficios no son tan evidentes en un elevado número de linfomas y menos aún en tumores sólidos, donde el cáncer ha desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune entre los que destacan la actividad inmunosupresora del microambiente tumoral (**TME**) y el agotamiento de las células T específicas frente al tumor. Para superar estos mecanismos, los investigadores han utilizado **diversas estrategias** como la edición genómica para eliminar las moléculas involucradas en los puntos del control inmunológico (PD-1, LAG-3, TIM-3, etc) y la **expresión de moléculas** que incrementen la eficacia/supervivencia de las células CAR-T.

Uno de los principales problemas encontrados en muchos cánceres es la **expresión de los receptores inhibidores PD-L1** por las células tumorales. Esta proteína se une a PD-1 en las células T, bloqueando su actividad efectora e induciendo agotamiento y muerte. Por lo tanto, uno de los objetivos más perseguidos en esta línea de trabajo ha sido **eliminar PD-1 en las células T**, con efectos claramente positivos en diferentes estudios preclínicos y en ensayos clínicos. Sin embargo, el efecto de la eliminación de PD-1 sobre las células CAR-T ha sido analizado principalmente en un **contexto de co-cultivo con células PD-L1+**. Esto hace que no se puedan observar potenciales efectos deletéreos en las células CAR-T PD-1 KO, debido a la ventaja que adquieren en presencia de su ligando.

Nuestra hipótesis es, por tanto, que **la edición de PD-1 podría afectar a la fisiología de las células CAR-T**, ya que esta proteína desempeña no solo un papel inhibidor de la respuesta T, sino que también tiene un **papel relevante** en el control de la potencia de la respuesta de las células T y esto, a su vez, está ligado a su supervivencia. Asimismo, pensamos que, para lograr una mayor actividad terapéutica, las células CAR-T PD-1 KO deberían de expresar de forma controlada **citocinas que mejoren su actividad** y las de otras células inmunes.

Por último, creemos que **las herramientas de edición genómica podrían permitir simultáneamente la eliminación de PD-1 y la expresión controlada de dichas citocinas**. El hecho de poder controlar la expresión de este tipo de moléculas en el tiempo y espacio, permitiría un mejor control y calidad de la actividad de las células CAR-T, incrementando así la potencia (mejor eficacia debido a la proliferación y fenotipo memoria de los linfocitos CAR en el TME) y la seguridad de la terapia como estrategia frente a ciertos efectos adversos como la CRS.



# OBJETIVOS

---

En base a nuestras hipótesis de partida nos planteamos los siguientes objetivos y subobjetivos:

- 1. PUESTA A PUNTO DE LOS SISTEMAS DE EDICIÓN GENÓMICA EN EL LOCUS *PDCD1* EN CÉLULAS T PRIMARIAS.**
  - 1.1. Optimización de las técnicas de EG en el locus de PD-1.
  - 1.2. Estudio de seguridad y eficacia de las estrategias en cuanto a cortes inespecíficos e integraciones del donador fuera del locus diana.
- 2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CAR-T PD-1 KO MEDIANTE TÉCNICA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR/Cas9.**
  - 2.1. Combinación de la edición genómica con vectores lentivirales para generar células CAR-T PD-1 KO.
  - 2.2. Caracterización de producto CAR-T antes de ser enfrentadas al tumor: proliferación, fenotipo y metabolismo.
- 3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL, FENOTIPO Y PERSISTENCIA DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1KO.**
  - 3.1. Generación de un modelo celular donde investigar el eje PD-1/PD-L1 en el ámbito de la terapia CAR-T.
  - 3.2. Caracterización del modelo generado Namalwa PD-L1+.
  - 3.3. Análisis de la actividad citotóxica, fenotipo y persistencia de células CAR-T PD-1 KO y células CAR-T WT frente a células Namalwa PD-L1+.
- 4. DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA GENERAR CÉLULAS CAR-T PD-1 KO SECRETORAS DE IL-15 TRAS ACTIVACIÓN MEDIANTE EDICIÓN GENÓMICA.**
  - 4.1. Optimización de la inserción específica de ADN en locus específicos en células T (KI).
  - 4.2. Generación de células pdTRUCKIL-15.
  - 4.3. Caracterización de fenotipo, proliferación y metabolismo de las células pdTRUCKIL-15 antes de enfrentarlas a tumor.
  - 4.4. Estudio de estrategia KI con DNAss método viral vs no viral.
- 5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTILEUCÉMICA DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15 FRENTE A LAS CÉLULAS NAMALWA PD-L1+.**



# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. CULTIVO CELULAR

### 1.1 LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares Namalwa (linfoma de Burkitt, ATCC® CRL-1432) y Jurkat (leucemia aguda de células T) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowest) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S, Biowest), en un entorno con una temperatura de 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas Namalwa-GFP-Nluc [255] y Namalwa-PDL1+ (generada en la presente Tesis), fueron cultivadas siguiendo el mismo procedimiento. La línea celular HEK-293T (células embrionarias humanas derivadas de riñón embrionario, ATCC® CRL-11268) se cultivaron en medio DMEM (Biowest) con un 10% de FBS y un 1% de P/S a 37°C en una atmósfera de 10% CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron sin superar una confluencia del 90% utilizando TryPLE (Gibco) 0.4% tras un lavado previo con PBS.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a la densidad celular recomendada por las instrucciones de la ATCC y fueron testadas regularmente para la presencia de micoplasma utilizando el kit MycoAlert Mycoplasma Detection (Lonza).

### 1.2 CÉLULAS T PRIMARIAS HUMANAS

Las células T primarias fueron obtenidas a partir de células mononucleares procedentes de sangre periférica de donantes sanos, adquiridas con el consentimiento informado en el Hospital Reina Sofía (Córdoba) así como procedentes del Biobanco del sistema sanitario público de Andalucía (Hospital universitario San Cecilio, Granada). El estudio se realizó de acuerdo con las directrices del comité de ética, cumpliendo con los requisitos de calidad y seguridad para la donación, obtención, almacenamiento, distribución y preservación de células y tejidos humanos bajo la normativa española. Reglamento (RD-L 9/2014).

La sangre fue diluida en una proporción de 1:2 a 1:4 en PBS, dependiendo de la densidad celular. Luego, se llevó a cabo la separación de las células por medio de Ficoll (Lymphosep, Biowest), utilizando 1/3 de Ficoll y 2/3 de la sangre diluida. mediante centrifugación sin freno ni aceleración a 300g durante 30 minutos. La fracción de células mononucleares (PMBCs) se recogió con una pipeta pasteur y se lavó dos veces a 200g durante 10 minutos para eliminar las plaquetas. Posteriormente, las PMBCs se cultivaron en medio TexMACS (un medio diseñado para el cultivo sin suero de células T, con albúmina sérica humana, glutamina estable y fenol rojo,

Miltenyi Biotec) con suplemento de 20 ng/ml de IL-2 (Miltenyi Biotec), 5% de suero humano AB (Biowest) y 1% de P/S (Biowest) a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células se activaron con T cell TransAct (una nanomatriz  $\alpha$ -CD3/CD28, Miltenyi Biotec, 1:100). Después de la activación, se realizaron pases cada 2 o 3 días manteniendo la densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/ml.

Para los experimentos realizados durante la estancia, las PBMCs se cultivaron en medio X-vivo (Lonza) suplementado con 20ng/mL de IL-2 (Miltenyi Biotec) y fueron activadas con bolitas magnéticas  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (Dynabeads, ThermoFisher). En todas las condiciones, después de 7-9 días de cultivo, la población de células T era superior al 90%.

## 2. PLÁSMIDOS, VECTORES LENTIVIRALES Y ADENOASOCIADOS

### 2.1. VECTORES LENTIVIRALES INTEGRATIVOS

- **Vector ARI-0001:** Este vector lentiviral (VL) de tercera generación, autoinactivado, expresa el CAR anti-CD19 de segunda generación ARI-0001 (A3B1/4-1BB/CD3 $\zeta$ ) bajo el control del promotor EF1 $\alpha$ . El plásmido fue generosamente proporcionado por el Dr. Manel Juan y la Dra. María Castella del Hospital Clínic en Barcelona. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre este vector en la referencia Castella et al., 2019.
- **Vector SPDL1:** El presente vector de tercera generación autoinactivado, diseñado en la base de datos de VectorBuilder, expresa la proteína PD-L1 bajo el promotor lentiviral SFFV y ha sido utilizado para generar la línea celular Namalwa.

### 2.2. VECTORES LENTIVIRALES NO INTEGRATIVOS (IDLVS)

- Los vectores IDLVs se han generado usando el plásmido **SE**, previamente generado y caracterizado por el grupo, en el que GFP se expresa bajo el promotor *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV). Además, en la presente tesis se han insertado diferentes elementos aisladores en el plásmido SE para generar nuevos vectores IDLVs: El elemento IS2, que combina el fragmento CHS4-650 y pSAR2, fue diseñado y sintetizado como se describe previamente en Benabdellah y cols. [302]. El plásmido **SE-SAR (in-LTR)** se generó mediante la inserción del elemento pSAR2 en el sitio Bbs1 del 3'LTR del plásmido SE. Los plásmidos **SE-IS2** y **SE-SAR** se generaron mediante la inserción de los elementos IS2 y pSAR2 en los sitios XhoI y KpnI del plásmido SE, respectivamente. El plásmido **SE HS4\_650** se generó mediante la inserción del elemento CHS4\_650 en el sitio KpnI del plásmido SE.

- Vector IDLV\_**eGFPTRAC**, generado por la empresa productora de vectores virales y no virales VektorBuilder, que expresa la proteína reportera eGFP. El constructo viral conta de: el promotor constitutivo viral SFFV seguido de un *cassete* de expresión para eGFP y de una cola poliA. Este transgén está flanqueado por dos brazos de homología de 300 pb, cada uno correspondiente a las secuencias 3' y 5' a ambos lados del sitio de corte del guía para el locus *TRAC* y, a su vez, por ambos LTR virales.

### 2.3. VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV)

- Vector **v6\_IL-15PDCD1**, generado por la empresa productora de vectores virales y no virales VektorBuilder, que expresa el ADNc de la citocina humana IL-15, seguido de una cola poliA y flanqueado por dos brazos de homología de 150 pb, cada uno correspondiente a las secuencias 3' y 5' a ambos lados del sitio de corte del guía 3 para el locus de *PDCD1* entre ambos ITR virales. Este constructo carece de promotor, permitiendo así la expresión del transgén bajo promotor endógeno.

- Vector **v6\_eGFPTRAC**, generado por la empresa productora de vectores virales y no virales VektorBuilder, que expresa la proteína reportera eGFP. El constructo viral conta de: el promotor constitutivo viral SFFV seguido de un *cassete* de expresión para eGFP y de una cola poliA. Este transgén está flanqueado por dos brazos de homología de 300 pb, cada uno correspondiente a las secuencias 3' y 5' a ambos lados del sitio de corte del guía para el locus *TRAC* y, a su vez, por ambos ITR virales.

## 3. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES Y TITULACIÓN

### 3.1. MAXI-PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

Para la producción a gran escala de plásmidos, se realizaron transformaciones en bacterias competentes *E. coli* Stbl3 (Life Technologies), y se seleccionó una colonia única. Se llevó a cabo una minipreparación utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguido de una digestión con HindIII para verificar la correcta amplificación del plásmido. Posteriormente, se realizó un cultivo del clon bacteriano a gran escala, generalmente de 300ml, en agitación a 220 rpm y a una temperatura de 37 °C durante toda la noche.

A partir de este cultivo, se llevó a cabo una maxipreparación de plásmido, utilizando el kit NucleoBond Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel) para el último paso con garantía de esterilidad. La cantidad de plásmido obtenida se cuantificó utilizando el NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher), y se evaluaron las relaciones de absorbancia de 260:280 y 260:230 nm para asegurar la ausencia

de contaminación cruzada. La confirmación de la maxiproducción del plásmido se llevó a cabo mediante digestión enzimática utilizando HindIII (New England Biolabs, así como por secuenciación Sanger.

Se prepararon alícuotas a una concentración de 1 µg/µl y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso. Este procedimiento garantiza la obtención de cantidades significativas de plásmido de alta calidad y la preservación de las muestras para futuras aplicaciones.

### **3.2. PRODUCCIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES**

Para el proceso de producción de vectores lentivirales (VLs), se emplearon células empaquetadoras HEK-293T, o sus variantes modificadas. En resumen, las células empaquetadoras se sembraron para alcanzar una densidad del 80%. Luego, se cotransfectaron con el plásmido de transferencia, el plásmido de empaquetamiento de VIH-1 (pCMVΔR8.9) disponible en [https://www.addgene.org/Didier\\_Trono/](https://www.addgene.org/Didier_Trono/), y el plásmido de la envuelta VSV-G (pMD2.G) también disponible en [https://www.addgene.org/Didier\\_Trono/](https://www.addgene.org/Didier_Trono/). La proporción de transfección fue de 10:7:3, utilizando polietilenimina (PEI) (Alfa Aesar) como agente transfectante. Este proceso se llevó a cabo en medio DMEM (Biowest) sin suero durante 20 minutos, tras lo cual la mezcla se añadió gota a gota sobre las células. Pasadas 5 horas, se cambió el medio a DMEM suplementado con 10% de FBS (Biowest), y el sobrenadante viral se recogió a las 48 y 72 horas, congelándolo a -80°C. El mismo procedimiento se llevó a cabo para generar los IDLVs pero en lugar de utilizar el plásmido de empaquetamiento pCMVΔR8, utilizamos el plásmido de empaquetamiento del VIH pCMVDRD8.74 modificado para la integrasa (gentilmente proporcionado por Howe S.J. en el Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, Londres, Reino Unido).

En los casos en que fuera necesario, los VLs se concentraron mediante ultracentrifugación utilizando el rotor SW32 Ti (Beckman) a 23.000 rpm durante 2 horas a 4°C.

### **3.3. TITULACIÓN**

El cálculo del título viral funcional (unidades transductoras por ml, UT/ml) se llevó a cabo mediante la transducción de células Jurkat, un modelo inmortalizado de células T que permite una mayor modificación genética. Se realizaron tres diluciones seriadas de sobrenadante lentiviral para asegurar la linealidad del proceso. Cinco días después de la transducción, se evaluó la expresión de la proteína de interés mediante citometría de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences). El título viral se calculó en aquellas condiciones donde el porcentaje de expresión

no superó el 30%. Este límite se estableció ya que por debajo del 30%, se considera que se ha integrado una sola copia de ADN, mientras que por encima de este umbral se pierde la linealidad debido a la inserción de varias copias de ADN viral. La fórmula utilizada para estimar el título viral fue la siguiente:

$$\text{Título UT/ml} = \frac{n^{\circ} \text{ de células} \times \% \text{ de células positivas}}{\text{volumen VLS (ml)}}$$

Adicionalmente, a partir del título viral, se calculó la multiplicidad de infección (MOI) mediante la fórmula:

$$\text{MOI} = \frac{\text{Título} \left( \frac{\text{UT}}{\text{ml}} \right) * \text{volumen VLS (ml)}}{N^{\circ} \text{ de células transducidas}}$$

### 3.4. ESTIMACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES DISPONIBLES EN EL SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE EMPAQUETAMIENTO

Para estimar la cantidad de partículas virales disponibles en el sobrenadante de las células de empaquetamiento, determinamos el número de unidades de transducción por mililitro (UT/mL) utilizando un kit de qPCR para la titulación de lentivirus (ABM, Richmond, Canadá). Convertimos la cantidad de copias virales por mililitro (GC/mL) a UT/mL según las indicaciones del fabricante.

El estudio se llevó a cabo en un Sistema de PCR en Tiempo Real Applied Biosystems 7500. Cada muestra se analizó en triplicado y se generó una curva de amplificación promedio.

### 3.5. ESTIMACIÓN DEL GENOMA DEL VECTOR VIRAL IDLV

**3** Los genomas episomales de los vectores IDLV en las células transducidas se determinaron de la siguiente manera: las células transducidas fueron lisadas después de tres días en cultivo y se extrajo el ADN genómico utilizando el kit QiAamp DNA Mini (Qiagen). 60 ng de este ADN genómico utilizó para realizar una PCR cuantitativa utilizando los pares de cebadores  $\Delta U3$  Fw (GATCTGCTITTTGCITGTACT) y PBS Rev (GAGTCCTGCGTCGAGAGAAGC), lo que nos permitió discriminar los genomas del vector viral del ADN total de IDLV porque la orientación de DU3Fw y PBS Rev solo permite la amplificación por PCR del genoma viral transcrito en sentido inverso. Como control interno, utilizamos cebadores para el locus de la albúmina

humana (hAlb, Fw: CCTGTAATCTCTTGTGGGCTGT y Rev: ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC). El ADN de las células transducidas se extrajo 72 horas después de la transducción utilizando un kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania); se utilizó el software del sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 para llevar a cabo las reacciones. Cada muestra se analizó en triplicado. La reacción de PCR consistió en 40 ciclos a 95°C durante 3s y a 62°C durante 30s, seguidos de la curva de fusión.

## 4. MODIFICACIÓN GENÉTICA

### 4.1. TRANSDUCCIÓN CELULAR

Las células T primarias, previamente activadas con T Cell TransAct (Miltenyi Biotec), fueron transducidas con diversos VLs y MOIs mediante espinoculación (800g durante 60 minutos a 32°C). Después de 5 horas de incubación en presencia de los VLs, las células se lavaron con PBS (300g, 10 minutos) y se sembraron a una densidad de  $10^6$  células/ml en medio TexMACS suplementado. El porcentaje de células transducidas se determinó mediante citometría de flujo al menos 72 horas después de la transducción.

Para la transducción de las líneas celulares en suspensión, se incubaron  $10^5$  células en un pocillo de una placa de 48 pocillos con diferentes vectores lentivirales (VLs) en un volumen máximo de 300  $\mu$ l. La transducción de las células Jurkat se llevó a cabo mediante espinoculación (800g, 30 min a 32°C). En todos los casos, tras 5 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS durante 5 minutos a 300g y cultivadas como se ha indicado previamente y sembradas de acuerdo con la densidad indicada por la ATCC. El porcentaje de células transducidas se determinó mediante citometría de flujo al menos 72 horas después de la transducción.

### 4.2. EDICIÓN GENÓMICA

Para llevar la técnica de **Knock-out (KO)** en esta Tesis doctoral se han editado los locus *TRAC* y *PDCD1*. En el caso del locus *TRAC*, la edición se puso previamente a punto en el laboratorio utilizando el ARNgTRAC (UCAGGGUUCUGGAUAUCUGUGGG, GenScript, 100 $\mu$ M). En el caso del locus de *PDCD1*, se realizó una comparativa entre dos guías ARNg1 (CGUCUGGGCGGUGCUACAAC UCCAGGCAUGCAGAUCCCAC, GenScript, 100 $\mu$ M) y ARNg3 (UCCAGGCAUGCAGAUCCCAC, GenScript, 100 $\mu$ M) para optimizar la eliminación de la expresión de PD-1. Para la generación de células T PD-1 KO o CAR-T PD-1 KO, las PBMCs fueron activados durante 24h y transducidos con los vectores lentivirales para expresar el CAR. 48 horas tras la transducción celular se llevó a cabo la edición genómica de estas células CAR-T WT. En el caso de

las células CAR-T PD-1 KO, las células fueron modificadas mediante el uso de la endonucleasa CRISPR/Cas9. En primer lugar, se formaron complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) incubando 3,3  $\mu\text{M}$  de la proteína Cas9 (IDT, 61 $\mu\text{M}$ ) con 10  $\mu\text{M}$  del ARN guía dirigido al primer exón del locus de PD-1 (ARNg3PD-1: UCCAGGCAUGCAGAUCCCAC, GenScript, 100 $\mu\text{M}$ ) en una proporción de 1:3 durante 20 minutos a 37°C. Durante este periodo, se determinó la densidad celular y la cantidad necesaria de células, las cuales fueron lavadas con PBS y luego con el tampón de electroporación (medio Opti-MEM, ThermoFisher). Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron suspendidas en la solución que contenía las RNPs, y se agregó Opti-MEM hasta alcanzar el volumen final de la cubeta de nucleofección (20 o 100  $\mu\text{l}$ , Lonza). La mezcla se electroporó utilizando el 4D-Nucleofector (Lonza) y el programa EH-115. Posteriormente, las células se recuperaron en medio TexMACS sin suplementos a 37°C y se sembraron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml, considerando que la viabilidad después de la electroporación era del 50%. Después de 5 horas, las células se diluyeron a  $1 \times 10^6$  células/ml añadiendo medio TexMACS suplementado al 2X. Tras 48 a 72 horas, las células se lavaron según fuera necesario y se cultivaron a  $1 \times 10^6$  células/ml en medio completo. De cinco a siete días después de la transducción, se determinó el porcentaje de células transducidas y editadas, junto con la caracterización fenotípica mediante citometría de flujo. La eficiencia de edición se confirmó mediante secuenciación sanger (ver detalles a continuación).

Para llevar a cabo la técnica de Konck-In (KI) y la generación de células pdTRUCKIL-15, el procedimiento fue exactamente el mismo, solo que añadiendo  $5 \times 10^4$  GC/mL del AVV6 v6\_IL-15PDCD1 veinte minutos tras la generación de los poros en las membranas y las roturas del ADN.

## 5. ANÁLISIS DE LAS EDICIONES GENERADAS

### 5.1. EDICIONES EN EL LOCUS DIANA (*ON-TARGET*)

Las células no modificadas (WT) y las modificadas genéticamente (CAR-T PD-1 KO, pdTRUCKIL-15) fueron lisadas entre cinco a siete días tras la edición, y se extrajo el ADN genómico utilizando el kit comercial QIAamp genomic DNA de Quiagen. La amplificación del ADN se realizó mediante el uso de KAPA2G Fast Hot Start Ready Mix de Sigma-Aldrich, utilizando 10 ng de ADN y los primers oligonucleotídicos señalados en la Tabla 5. Todas las reacciones se llevaron a cabo en duplicado en el termociclador Veriti de ThermoFisher, con el siguiente programa: 1x (95°C, 5min); 40x (94°C, 45 seg / 60°C, 20 seg / 72°C, 30 seg); 1x (72°C, 10 min). Para la secuenciación Sanger, los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification de Quiagen. Las secuencias resultantes se analizaron utilizando el programa ICE (*Inference of CRISPR Editing*,

<https://ice.synthego.com/>), el cual proporciona información sobre la eficiencia de edición y la distribución de inserciones/deleciones (INDELS).

## 5.2. EDICIONES FUERA DEL LOCUS DIANA (*OFF-TARGET*)

Se utilizó la herramienta informática CHOPCHOP (disponible en <https://chopchop.cbu.uib.no>) para realizar una predicción *in silico* de los posibles efectos fuera de la secuencia diana (*off-targets*) del guía ARNg3 PD-1. Se seleccionaron cinco posibles sitios, los cuales fueron posteriormente analizados en el ADN de las células editadas y no editadas mediante secuenciación Sanger y el programa ICE. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se detalla en la tabla 5.

NOMBRE	SECUENCIA
ARNg1	CGUCUGGGCGGUGCUACAAC
Ontarget Guide1 Fw	TCACTCTCGCCCACGTGGA
Ontarget Guide1 Rev	GCCTCCCCACGGATGGTCT
ARNg3	UCCAGGCAUGCAGAUCCCAC
Ontarget Guide3 Fw	ATCTCCTCTGTCTCCCTGTCTC
Ontarget Guide3 Rev	AGGCCTCCCCACGGATGGT
PD-1 OFF_Guide3 1 Fw	GTTGCCGTTACAGTCTGCTCCG
PD-1 OFF_Guide3 1 Rev	AAGCGGTGTTGGCCTCCTCTGG
PD-1 OFF_Guide3 2 Fw	ATTTATTTTGGACAATCACCAGGGG
PD-1 OFF_Guide3 2 Rev	ATACATAACGTCTCTGCAAAGGGA
PD-1 OFF_Guide3 3 Fw	ATAAATCCAGTGCCTCATCCCT
PD-1 OFF_Guide3 3 Rev	TACAAAAATAAGCCAGGCACGGT
PD-1 OFF_Guide3 4 Fw	GCTTAACTGAGGTGATTTAAAGACC

PD-1 OFF_Guide3 4 Rev	TCGTTAGAATTCAAAGCAGGAC
PD-1 OFF_Guide3 5 Fw	AGGAATGCAACCACAACAACT
PD-1 OFF_Guide3 5 Rev	ATTCTTCCTCCCTGTGTGTTTT

Tabla 5. Secuencias de los guías y oligonucleótidos empleados en la edición genómica del locus de *PDCD1* y su análisis.

## 6. EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA (qPCR)

A partir de aproximadamente  $7 \times 10^5$  células T editadas y no editadas, se extrajo el ARN mensajero mediante el kit RNeasy Plus Mini de Qiagen. A continuación, se procedió a la retrotranscripción (RT-PCR) para conseguir finalmente un ADNc (ADN complementario) utilizando el kit High-Capacity ADNc Reverse Transcription de ThermoFisher siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó la misma cantidad de ARNm en todas las muestras y se aplicó el siguiente programa en un termociclador Veriti de ThermoFisher: 1x (95°C, 15 minutos); 40x (95°C, 15 segundos / 60°C, 30 segundos / 72°C, 30 segundos); 1x (95°C, 1 minuto / 55°C, 30 segundos / 95°C, 30 segundos).

Tras la obtención del ADNc se llevó a cabo la PCR en tiempo real (qPCR) por duplicado en todas las muestras. Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos descritos en la tabla 6 para el análisis de la expresión de diferentes genes (por orden, IL-15 donador, IL-15 exógena, IL-15 Endógena, BIM y Bcl-xL para el estudio de la expresión de proteínas apoptóticas). El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 1x (95°C, 15 minutos); 40x (95°C, 15 segundos / 60°C, 30 segundos / 72°C, 30 segundos); 1x (95°C, 1 minuto / 55°C, 30 segundos / 95°C, 30 segundos). Se utilizó el kit KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) de Kapa Biosystems, manteniendo la misma cantidad de ADNc en todas las muestras. Como control negativo de la PCR, se empleó agua ultrapura de Invitrogen. Los resultados se normalizaron en relación con el ADNc de GAPDH (ver Tabla 6). El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el programa MxPro de Agilent calculando los cambios relativos de expresión génica utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [170].

NOMBRE	SECUENCIA
3' IL-15 <i>On Target</i> G_3 Fw	TGGGGATGCGGTGGGCTCTA
3' IL-15 <i>On Target</i> G_3 Rev	CAGAGCTGGGGCCAAGGCT

<b>cDNA IL-15 Fw</b>	ACTTGTGTTTACTTCTAAACAGTC
<b>cDNA IL-15 Rev</b>	TTTGCAACTGGGGTGAACATCA
<b>ADNc IL-15 Fw 3.0</b>	CAGTTTGTCTTCTAATGGGAAT
<b>GFP Rev 3</b>	CGTCCAGCTCGACCAGGAT
<b>BIM Fw</b>	CCCTCCTETTCTECCAATETE
<b>BIM Rev</b>	TCTATCCCTACTCCTTCCCCCT
<b>Bcl-xL Fw</b>	TCCAAGGCTOTAGGTOGTCA
<b>Bcl-xL Rev</b>	GGGCATTGAGTGACCTGACA
<b>GAPDH Fw</b>	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC
<b>GAPDH Rev</b>	TGGTACATGACAAGGTGCGG

Tabla 6. Información sobre las secuencias de los oligonucleótidos empleados en el análisis de edición genómica de KI para generar células pdTRUCKIL-15.

## 7. FRECUENCIAS DE EDICIÓN DE ALELOS MEDIANTE ddPCR

La integración del transgen de v6\_IL15PDCD1 en el locus *PDCD1* se determinó mediante un ensayo de ddPCR dúplex. El ADN genómico de las células editadas se mezcló con dos juegos de cebadores/sondas: uno de referencia (Ref Fw y Rev) junto con su sonda (HEX) y otro con el cebador hacia aguas arriba del brazo de homología derecho (*PDCD1\_Rev* outside 3' HA) y el cebador y la sonda (FAM) ubicados la cola PoliA (ROB79). Se generaron gotas mediante un generador de gotas automatizado Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), se amplificaron por PCR utilizando un termociclador Bio-Rad y se analizaron mediante un lector de gotas Bio-Rad QX200. Las frecuencias de integración se determinaron por la proporción de gotas doblemente positivas con respecto a todas las gotas positivas de referencia mediante el programa QuantaSoft™ Analysis Pro.

<b>NOMBRE CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA 5' – 3'</b>
<b>Ref Fw</b>	AAGCTATGCAGGTGACAG

<b>Ref Rev</b>	AGGTAGTTTCTGAACTTCTCC
<b>Sonda Ref</b>	ATGCAGCAGTGCATCCC-HEX-ZEN-IBFQ
<b>ROB79 Fw</b>	GGGAGGATTGGGAAGACA
<b><i>PDCD1</i> _Rev outside 3'HA</b>	GTTTGGGGTTCTGGCCAGCC
<b>Sonda nuestra</b>	CCCACTGACGGGCACCGGA-FAM-ZEN-IBFQ

**Tabla 7. Información sobre las secuencias de los oligonucleótidos y sondas empleados en el análisis de integración específica del transgén en el locus *PDCD1*.**

## 8. PURIFICACIÓN DE ADNsc

### 8.1. MEDIANTE KIT COMERCIAL

Los donadores de ADNsc se produjeron utilizando un kit comercialmente disponible (Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japón, 632644, 632666), siguiendo básicamente las instrucciones del fabricante [303]. En primer lugar, se prepararon plantillas de ADN bicatenario mediante PCR estándar.

A continuación, los sustratos iniciales de ADNdc para las reacciones de exonucleasa se amplificaron con un par de cebadores, uno fosforilado en la posición 5' y otro normal, utilizando una enzima de PCR de alta fidelidad (polimerasa PrimeSTAR Max DNA, Takara Bio). Los productos de PCR se purificaron mediante columna NucleoSpin (Takara Bio). Luego, las cadenas fosforiladas del dúplex se degradaron selectivamente con la mezcla Strandase A (37 °C, 5 min para 1000 pb de longitud, seguido de desactivación por calor a 80 °C, 5 min) para obtener ADNsc. A continuación, para completar la degradación selectiva, agregamos la mezcla Strandase B a la mezcla de reacción (37 °C, 5 min para 1000 pb de longitud, seguido de desactivación por calor a 80 °C, 5 min). Se verificó una pequeña porción de la mezcla de reacción en la electroforesis en gel de agarosa para confirmar la pureza del ADNsc, y luego la mezcla restante se purificó mediante la columna NucleoSpin (Takara Bio) para obtener ADNsc.

### 8.2. PROTOCOLO MANUAL

Para producir manualmente donantes de ADNsc sin utilizar el kit comercial, tratamos los sustratos de ADNdc preparados mediante los mismos procedimientos de PCR descritos anteriormente con la exonucleasa Lambda (New England BioLab, Ipswich, MA, EE. UU., M0262, 10 unidades por 10 µg de ADNdc) a 37 °C durante 30 min para degradar las cadenas fosforiladas

en 50 del ADN bicatenario, seguido de desactivación por calor a 75 °C durante 10 min. Luego, se añadió la Exonucleasa III (Takara Bio 2170A, 90 unidades por 10 µg de ADNdc) a la mezcla (37 °C, 5 min para 1500 pb, seguido de desactivación por calor a 65 °C, 5 min) para completar la producción de ADNsc. El ADN monocatenario resultante se purificó mediante la columna NucleoSpin (Takara Bio) después de confirmar la pureza mediante electroforesis. [209]

## 9. CITOMETRÍA DE FLUJO

### 9.1 DETECCIÓN DEL CAR

La expresión del CAR  $\alpha$ -CD19 se determinó utilizando un anticuerpo IgG1 de cabra específico para la región Fab murina, conjugado a biotina (Jackson Immunoresearch, 115-065-072 Filadelfia, EE. UU.) [170] seguido de una incubación con estreptavidina-APC (Thermo Fisher) como anticuerpo secundario. En este proceso, alrededor de 50.000 células fueron lavadas con un buffer de lavado para CF (PBS+3% BSA+2mM EDTA) e incubadas con el anticuerpo anti-Fab murino (1:100) durante 20 minutos en frío. Tras un lavado con el buffer de lavado, se añadió la estreptavidina-APC (1:330). Después de 15 minutos, se realizó la tinción extracelular para el marcaje fenotípico y de otros marcadores deseados durante otros 15 minutos adicionales. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS dos veces antes de ser adquiridas en los citómetros FACSCantoll o FACS Verse (Beckton Dickison Biosciences).

### 9.2 DETECCIÓN DE hIL-15

Aproximadamente 100.000 células fueron lavadas y teñidas con los marcadores de superficie deseados. Posteriormente, se llevó a cabo la fijación y permeabilización mediante el uso del kit Fix & Perm de Nordic MUBio. Brevemente, se añadieron 80 µl del reactivo de fijación A durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas, y fueron permeabilizadas con 80 µl del reactivo de permeabilización B durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sin realizar lavados adicionales, se incorporó el anticuerpo anti-hIL-15 APC (MA5-23627, 1:20, ThermoFisher) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo dos lavados con PBS y, finalmente, se procedió a la adquisición de datos en los citómetros de flujo anteriormente mencionados.

### 9.3 ESTUDIO DEL FENOTIPO Y AGOTAMIENTO DE LAS CÉLULAS EDITADAS

Se emplearon diversos anticuerpos monoclonales de superficie para llevar a cabo la caracterización fenotípica de las células T. Estos incluyeron hCD62L-PE-Cy7/APC-Cy7 (1:200),

hCD45RA-FITC/Pacific Blue (1:200), hCD3-PerCP-Cy5.5/APC-780/BV711 (1:200), hTIM3-APC-Cy7/PE-CF594 (1:100), hLAG3-PE/eFluor506/AlexaFluor700 (1:100), hPD-L1-APC (1:100) y hPD1-APC/PE (1:100) de ThermoFisher y Biolegend. En general, las tinciones extracelulares fueron llevadas a cabo durante 30 min en hielo y oscuridad.

Para la definición de las subpoblaciones de células T, se utilizaron los marcadores CD45RA y CD62L de la siguiente manera: T Naive/T Madre memoria (TN/TSCM): CD45RA+CD62L+; T Memoria Central (TCM): CD45RA-CD62L+; T Memoria Efectora (TEM): CD45RA-CD62L-, y T Efectora (TEF): CD45RA+CD62L-.

En general, la estrategia de análisis incluyó la selección de singletes y exclusión de células muertas mediante el uso de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Fisher) en el momento de la adquisición, siempre que los canales correspondientes al láser violeta estuvieran disponibles y en ausencia de permeabilización celular. El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo V10 (TreeStar).

## 9.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS RATÓN/HUMANO DEL MODELO IN VIVO

Tras la obtención de suspensiones celulares procedentes de los diferentes órganos tras el sacrificio de los modelos animales, los receptores Fc $\gamma$  murinos fueron bloqueados con anti-CD16/CD32 murino (eBioscience, ThermoFisher), FcR *blocking* (1:150, Miltenyi) y suero de ratón al 5% durante 20 min en hielo. Tras un lavado con buffer de lavado, se procedió a la tinción extracelular de las muestras para la detección de hCD19-APC-Cy7 (1:200), hPDL1-APC (1:100) y GFP por citometría de flujo.

## 10. ESTUDIOS FUNCIONALES

### 10.1 ACTIVACIÓN-AGOTAMIENTO CELULAR

Se plaquearon entre  $1.5$  y  $2 \times 10^6$  células por duplicado en un pocillo de una placa de 48 pocillos y se activaron con TransAct (1:100, Miltenyi Biotec) en uno de los duplicados. Tres días después se recogió el sobrenadante de los pocillos activados y no activados para realizar los experimentos de secreción de IL-15 y expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. Además, se recolectaron los pellets de cada pocillo para extraer el ARN o el ADN genómico y realizar los estudios posteriores.

## 10.2 SECRECIÓN DE IL-15.

Para investigar la presencia de IL-15 humana secretada al medio, empleamos el Kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-15 (Biolegend). Se recogieron los sobrenadantes de las células WT, PD-1 KO y pdTRUCKIL-15 tras tres días de activación continuada y se determinó la concentración de IL-15 secretada al medio mediante extrapolación a la curva patrón del kit mencionado anteriormente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 10.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

La capacidad citotóxica de las células CAR-T  $\alpha$ CD19 se evaluó mediante co-cultivo secuencial con células tumorales CD19+. Se emplearon las líneas Namalwa (derivadas de linfoma de Burkitt (CD19+), que expresan eGFP-Nanoluciferasa (NLuc) de forma constitutiva (100% eGFP+) para su monitorización *in vitro* e *in vivo*. Concretamente, la línea Namalwa eGFP-NLuc WT junto con las Namalwa PD-L1+ (línea expresora de PDL1+ mediante transducción lentiviral, generada en la presente Tesis a partir de la línea Namalwa eGFP-NLuc). Las células CAR-T y las células diana se co-cultivaron en varias réplicas en un ratio 12.5:1 Diana:efectoras\_CAR en medio RPMI no suplementado. La ratio usada considera  $2.5 \times 10^4$  células Namalwa en una placa de 96 pocillos con fondo de "U", junto con  $10^4$  células CAR-T expresando alrededor de un 20% de CAR ( $\sim 5 \times 10^4$  células T totales). Como control, las células tumorales se co-cultivaron con células no transducidas (NT,  $5 \times 10^4$  células). Tras 48h, se determinó el conteo absoluto de células diana y efectoras (Count Absolut Bright, ThermoFisher), así como el fenotipo de las células T mediante citometría de flujo. Se añadieron nuevas células Namalwa a cada réplica cuando >80% de las células tumorales fueron lisadas (R, Reencuentro).

El porcentaje de lisis de células diana CD19+ se determinó mediante citometría de flujo como la pérdida de GFP en comparación con el porcentaje inicial de células Namalwa en el cultivo a tiempo 0.

$$\text{Porcentaje de Lisis} = 1 - \left( \frac{\% \text{ Células Namalwa a tiempo final}}{\% \text{ Células Namalwa a tiempo inicial}} \right) \times 100$$

## 11. MODELO ANIMAL

Para establecer el modelo murino de linfoma de Burkitt, se introdujeron  $0,3 \times 10^6$  células Namalwa GFP-NLuc (WT o PDL1+) mediante inyección intravenosa en ratones NOD/scid-IL-2Rnull (NSG) de 10 a 12 semanas de edad y se monitorizó la progresión tumoral mediante bioluminiscencia. Para ello, se diluyó el reactivo de la NLuc, furimazina (NanoGlo, Promega), 60

veces en PBS (Biowest) y se administraron 150  $\mu$ l a los ratones por vía intraperitoneal justo antes de la adquisición de imágenes, utilizando el analizador IVIS Spectrum (Caliper, Perkin Elmer). Las imágenes se capturaron durante 3 minutos en campo abierto y se analizaron con Living Image 3.2 (Perkin Elmer) o AURA Imaging 4.0.7 (Spectral Instruments Imaging).

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical cuando mostraron una alta señal de bioluminiscencia, pérdida de peso >20% del peso inicialo evidentes signos de dolor o síndrome de hiperinflamación del injerto contra el huésped (EICH). La prioridad se mantuvo en la preservación del bienestar de todos los animales de experimentación por encima de la obtención de resultados.

Se analizaron muestras de sangre, médula ósea, hígado, bazo y cerebro. La sangre se extrajo por punción cardíaca directa post-sacrificio y se diluyó 1/5 en EDTA. Las células del hígado y del bazo se obtuvieron por disrupción mecánica y las de la médula ósea por perfusión de ambos fémures y tibias. Las células del cerebro se obtuvieron tras la su homogenización y separación en gradiente de Percoll. Todas las suspensiones celulares fueron disgregadas tras pasar por un filtro de 40 $\mu$ m antes de la tinción para citometría descrita previamente.

## 12. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA

Después de 3 días de la estimulación continua con  $\alpha$ -CD3/CD28, se evaluó la función mitocondrial de las células CAR-T WT, PD-1 KO y pdTRUCKIL-15 mediante diversos parámetros metabólicos utilizando el equipo Agilent Seahorse XF HS Mini Analyzer y el kit comercial T cell metabolic profiling de Agilent Technologies. Las células CAR-T fueron lavadas, contadas y suspendidas en medio XF RPMI, que contenía 10 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato sódico. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pocillo en las miniplacas XFp PDL. Durante la calibración del instrumento, las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador sin CO<sub>2</sub>.

Se midieron las tasas OCRs y de ECARs en condiciones basales y después del tratamiento con 1,5  $\mu$ M de oligomicina A (inhibidor de la ATP sintasa), 2,5  $\mu$ M de BAM15 (desacoplador mitocondrial) y 0,5  $\mu$ M de rotenona con 0,5  $\mu$ M de antimicina A (inhibidor mitocondrial) de Agilent Technologies además de las capacidades energéticas y respiratorias mitocondriales como la SRC, la liberación de protones o la generación de ATP. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa Seahorse Analytics, disponible en <https://seahorseanalytics.agilent.com/>.

## 13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Prism 9 de GraphPad Software Inc. Los ensayos estadísticos específicos realizados se detallan en la leyenda de cada figura. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). En resumen, las comparaciones entre dos grupos se calcularon mediante la prueba T-test o el test de Wilcoxon Mann Whitney, según correspondiera.

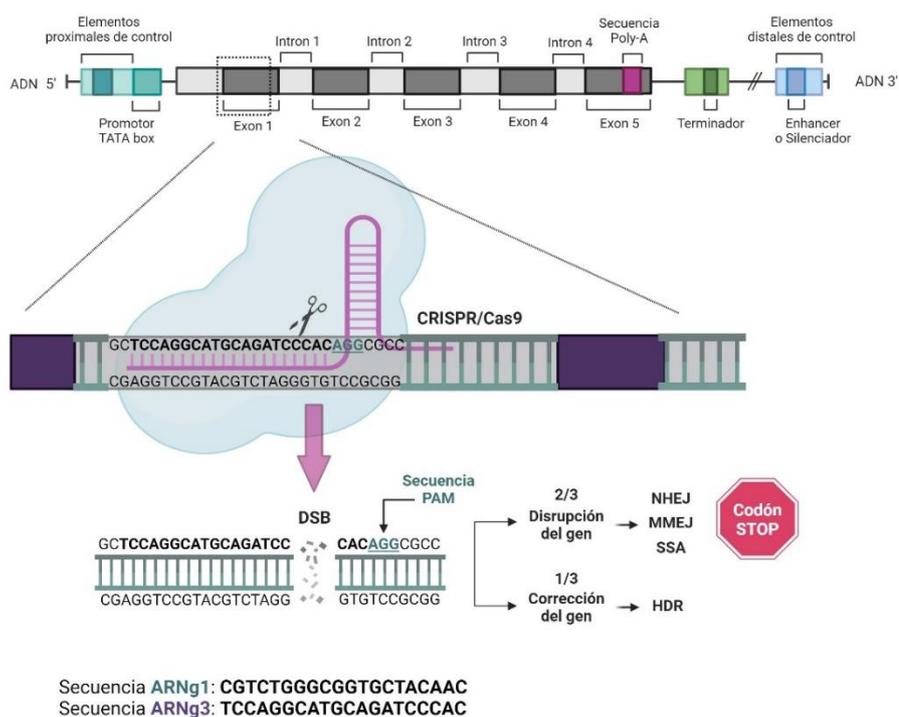


# RESULTADOS

## 1. PUESTA A PUNTO DE LOS SISTEMAS DE EDICIÓN GENÓMICA EN EL LOCUS *PDCD1* EN CÉLULAS T PRIMARIAS

### 1.1 OPTIMIZACIÓN DE LA GENERACIÓN DE DSB EN EL LOCUS DE PD-1

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral es eliminar la expresión de PD-1 en las células CAR-T para evitar la inmunosupresión ejercida por PD-L1 expresado en las células tumorales del TME [74]. Se han destacado previamente varias estrategias para evitar esta interacción, siendo las más comunes el uso de anticuerpos monoclonales diseñados frente a PD-1 o PD-L1 o la edición genómica (EG) del gen *PDCD1* en las células CAR-T. En base a nuestra experiencia previa en edición en el laboratorio, elegimos el sistema CRISPR/Cas9 como método de edición genómica para eliminar PD-1 y bloquear esta interacción.



**Figura 17. Esquema representativo de la estrategia de knock-out (KO) de PD-1.**

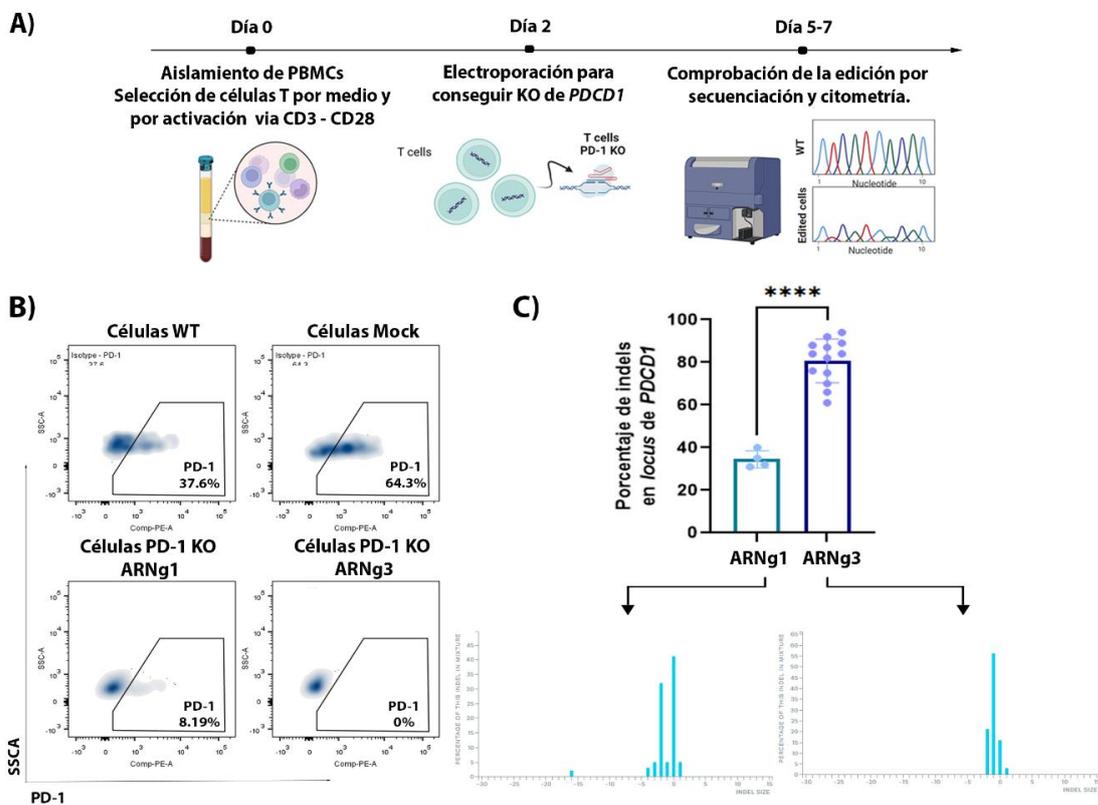
**A)** Esquema representativo del gen *PDCD1*. Ilustración que proporciona un contexto visual de la estructura del gen *PDCD1*, con cinco exones.

**B)** Esquema detallado de la estrategia de edición genómica enfocada en el exón 1 del locus *PDCD1*. Se muestra la secuencia diana del guía 3 (ARNg3) y la secuencia PAM. Aproximadamente, dos tercios de las roturas de doble cadena (DSB) generadas darán lugar a inserciones y deleciones (INDELs), culminando en la generación de un Knock-out (KO) efectivo de PD-1.

**C)** Secuencia de los guías utilizados frente al exón 1 de *PDCD1* en este trabajo.

Figura creada con BioRender.com.

La técnica de KO se llevó a cabo mediante la entrega de la endonucleasa en forma de ribonucleoproteína (RNP), formada tras la formación del complejo Cas9 con el ARNg dirigido frente a PD-1 y su posterior electroporación (**Figura 17**) como se describe en materiales y métodos. Para conseguir la edición del gen en cuestión, seleccionamos dos guías distintos diseñados frente al exón 1 del locus *PDCD1* (**Figura 17B**). En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la EG en linfocitos T aislados de una fracción total de PBMCs, que se seleccionaron previamente mediante gradiente de centrifugación a partir de sangre humana. Los linfocitos T se seleccionaron mediante adición de medio específico y activación con una nanomatriz  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 (**Figura 18A**). Dos días tras su activación, los linfocitos T se electroporaron con las RNPs formadas por los dos guías frente a PD-1 (ARNg1 y ARNg3) y la eficacia de la EG fue medida por citometría de flujo y secuenciación sanger. Los datos mostraron que el ARNg3 es el más eficaz de los dos, reduciendo la expresión de PD-1 en las células T editadas y activadas desde un 64.3% hasta un 0% en comparación con el ARNg1 (8.19%) (**Figura 18B**). En consonancia con lo observado por citometría, los datos de la secuenciación mostraron que el ARNg3 es el más efectivo, generando una media de un 78.93% de INDELS en comparación con el ARNg1, que presenta una media de un 33%. Ambos guías presentaron una distribución de INDELS similar, con modificaciones de entre 0 y 5 nt (principalmente deleciones), aunque el ARNg3 se caracteriza por generar INDELS más pequeños que el guía 1 (**Figura 18C**). En base a estos resultados, decidimos usar el ARNg3 para los futuros experimentos.



**Figura 18. El guía 3 es el más eficaz para generar células t PD-1 KO.**

**A)** Esquema de trabajo llevado a cabo para realizar los experimentos de células T PD-1 KO.

**B)** Gráficos de citometría representando la expresión extracelular de PD-1 tras tres días de activación celular con nanomatriz  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28. Las células T PD-1 KO generadas con el ARNg3 presentan una ausencia total de expresión de PD-1 en comparación con las células T WT.

**C)** Gráfica representativa del porcentaje de generación de INDELS en el locus de *PDCD1* con ambos guías de estudio. El ARNg3 presenta una eficiencia significativamente mayor que el ARNg1 (n=5, p valor = <0.0001). Las gráficas inferiores muestran la distribución de generación de INDELS de ambos guías.

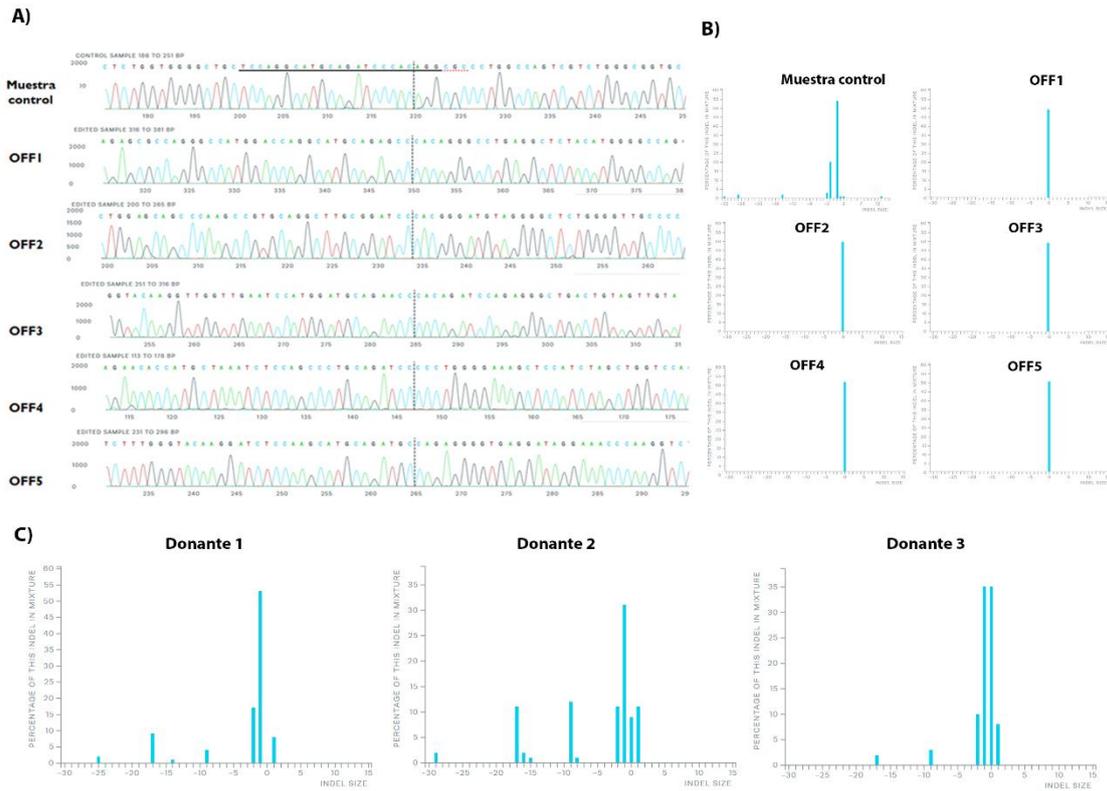
Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico desarrollado es un T-test pareado de dos colas.

## 1.2 ESTUDIO DE SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA GENERACIÓN DE DSBs

La tecnología CRISPR/Cas9 ha sido asociada con la generación de cambios en la secuencia diana, o INDELS, tanto en la región deseada, sitios *on-target*, como en lugares no específicos, conocidos como *off-targets*. Además, puede dar lugar a alteraciones estructurales, como translocaciones o grandes deleciones, como un efecto secundario durante la reparación de las roturas de doble cadena (DSB) inducidas por Cas9 [192].

En primer lugar, examinamos posibles diferencias en la frecuencia de INDELS fuera del sitio diana. A partir de células T editadas para el gen de *PDCD1* con eficiencia similar (aproximadamente 80%), observamos que ninguno de los 5 *off-targets* predichos *in silico* fue editado mediante análisis por ICE (Synthego) (**Figura 19A/B**).

Luego, analizamos la distribución de los INDELS en el sitio diana (**Figura 19C**) en células T de tres donantes sanos diferentes. Las deleciones de 1 nucleótido (nt) son las modificaciones predominantes en todos los donantes. En cambio, hay variabilidad entre ellos a la hora de la formación de deleciones de mayor tamaño. El donante 2 muestra una deleción de 9 nts con una frecuencia de un 13% mientras que en los donantes 1 y 3, esa deleción muestra una frecuencia menos del 5%. De igual manera que el donante 1 muestra una deleción mayor de 26 nts, el donante 2 de 29 nts y el donante 3 de 17 nts, todos con una frecuencia menor del 5%. Esto sugiere que el tipo y la frecuencia de los INDELS dependen en cierta medida del donante utilizado a pesar de utilizar el mismo sistema y procedimiento para la EG.



**Figura 19. Estudio de la seguridad de edición del gen *PDCD1* con el ARNg3.**

**A)** Secuencias obtenidas por secuenciación Sanger para los diferentes *off-targets* determinados *in silico* para el locus de *PDCD1* en las muestras editadas con el ARNg3. La línea de puntos negra representa el punto de corte.

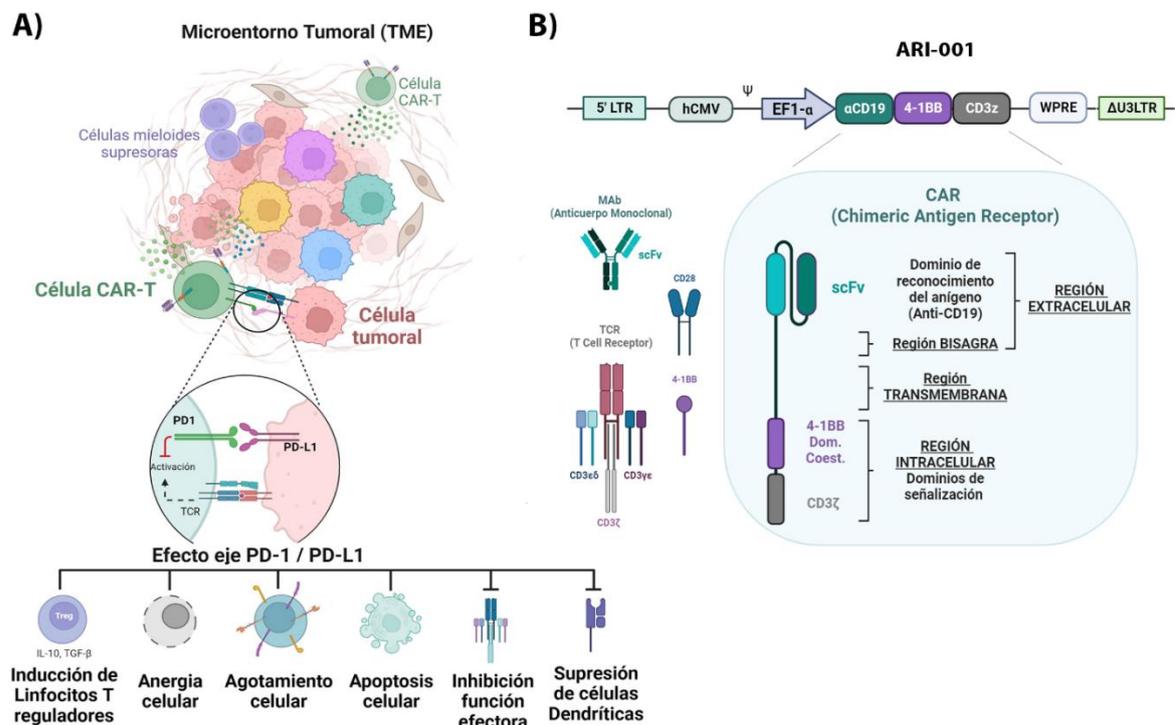
**B)** Gráficas mostrando la distribución de INDELs por secuenciación Sanger y analizados con el programa ICE de los *off-target* predichos *in silico*.

**C)** Distribución de INDELs por secuenciación Sanger y analizados con el programa ICE generados con el ARNg3 en células T de tres donantes distintos mostrando la variabilidad entre donantes, con la delección de un máximo de 29 nts, pero a una baja frecuencia.

## 2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CAR-T PD-1 KO

En la **Figura 20A** se destacan los principales problemas desencadenados por el eje PD-1/PD-L1 en el TME [74] sobre la inmunovigilancia: la inducción de linfocitos T reguladores y subsiguiente liberación de citocinas inhibitoras, la anergia, agotamiento y apoptosis celular, así como la inhibición de la función efectora de las células T. Todos estos efectos se ven reflejados en un deterioro de la inmunovigilancia en el TME y, por tanto, una posterior progresión del tumor en el paciente. Para evitarlo, decidimos abordar este eje mediante la EG de PD-1. Sin embargo, existen estudios que indican que esta eliminación podría tener efectos deletéreos sobre la funcionalidad de las células CAR-T [304]. Este primer apartado de la Tesis se basa en un análisis en profundidad de los efectos positivos y negativos de la eliminación de PD-1 en las células CAR-T.

El CAR que será utilizado es el ARI-001 (**Figura 20B**) por su potencial en aplicación clínica y gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Manel Juan en el Hospital Clínic. Se trata de un CAR de segunda generación, con 4-1BB y CD3 $\zeta$  como dominios intracelulares de señalización, diseñado frente a CD19 y bajo la expresión del promotor EF1- $\alpha$ .



**Figura 20. Estructura del CAR ARI-0001 y efectos del eje PD-1 / PD-L1.**

**A)** Esquema representativo de los efectos negativos derivados del eje PD-1 / PD-L1 en el TME.

**B)** Esquema de la secuencia y estructura del CAR  $\alpha$ CD19 utilizado en esta Tesis Doctoral (ARI-0001).

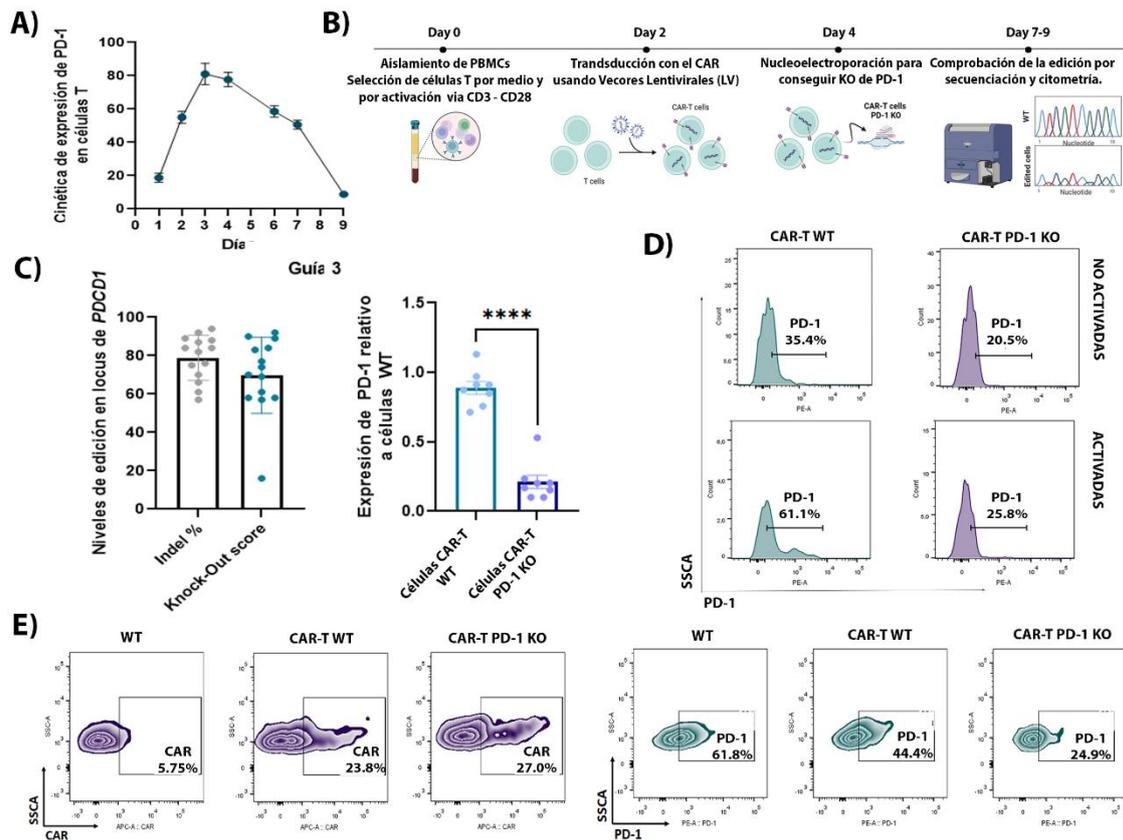
## 2.1. COMBINACIÓN DE LA EDICIÓN GENÓMICA CON VECTORES LENTIVIRALES PARA GENERAR CÉLULAS CAR-T PD-1 KO

Una vez elegido el ARNg para la edición de PD-1 usando la tecnología CRISPR/Cas9 en base a la eficiencia y seguridad, combinamos la estrategia de EG con la estrategia de adición génica (AG), para conseguir células CAR-T PD1-KO utilizando vectores lentivirales como vectores de entrega genética.

Previo al paso de generar células CAR-T PD1-KO, y dado que PD-1 es una proteína con un patrón de expresión complejo (expresándose diferencialmente en células T activadas y agotadas), se procedió a investigar la cinética de expresión de PD-1 en las células T (**Figura 21A**), observándose el pico máximo a día tres tras una activación celular continuada con una nanomatriz  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 añadida al medio y retirada a tiempo final del experimento mediante lavado celular.

A continuación, se procedió a generar células CAR-T PD1-KO como se describe en la **Figura 21B** y en la sección de materiales y métodos. Brevemente, las células T fueron transducidas con vectores lentivirales que expresan el CAR ARI-0001, utilizando un MOI de 10 y dos días después se electroporaron con la RNP (Cas9+ARNg3). A partir del tercer día de edición se realizan los estudios pertinentes de estas células. Los estudios a nivel de secuenciación sanger revelaron que este guía generaba alrededor de un porcentaje de INDELS de un 78.93 y presentaba una media de *Knock-out score* de un 70% (**Figura 21C**). A continuación, se determinó la expresión de PD-1 en células T sin editar y editadas tres días tras su activación. Los datos mostraron que la EG reducía la expresión de PD-1 desde un 61.1% en células CAR-T WT activadas a un 25.8% en células CAR-T PD1-KO activadas (**Figura 21D**).

La **Figura 21E izquierda** muestra cómo la edición de PD-1 no afecta a la expresión del CAR (23.8% en células CAR-T WT frente a un 27% en células CAR-T PD-1 KO). También estudiamos si el hecho de expresar el CAR en las células diana tendría algún efecto sobre la edición y/o expresión de PD-1. Como se puede observar en los datos de citometría de la **Figura 21E derecha**, la reducción de la expresión de PD-1 era independiente de la expresión del CAR en las células.



**Figura 21. La expresión del CAR no afecta a la edición del gen PDCD1.**

**A)** Cinética de la expresión de PD-1 tras tres días de activación celular de células T WT (n=5). Los linfocitos T aislados previamente de PBMCs, fueron activados como se describe en materiales y métodos mediante la adición de una nanomatrix  $\alpha$ -CD3 /  $\alpha$ -CD28, que no se retiró hasta punto final del experimento induciendo así una activación continua de los linfocitos T. La expresión de PD-1 se estudió por citometría, mediante tinción extracelular.

**B)** Esquema de trabajo llevado a cabo para obtener el producto de células CAR-T PD-1 KO.

**C)** Evaluación del porcentaje de INDELs y del *Knock-out score* generado mediante el uso de RNP(CRISPR/Cas9-ARNg3) en las células CAR WT y PD-1 KO (n=14). Datos obtenidos a través de la página de Synthego (**izquierda**). Reducción de la expresión de PD-1 en células CAR-T PD-1 KO (P valor = <0,0001) relativizado frente a células CAR-T WT (**derecha**) tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.

**D)** Estudio de la reducción de expresión de PD-1 de células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO activadas y no activadas medido por CF. Una vez recuperadas las células CAR-T PD-1 KO tras la edición y tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28, las células CAR-PD-1 KO activadas no presentan un incremento de la expresión en PD-1, como sí ocurre en las células CAR-T WT.

**E)** Gráficos de citometría representando la expresión del CAR (**izquierda**) y de PD-1 (**derecha**) en células WT, CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28. Muestran cómo la edición de PD-1 no afecta a la expresión del CAR, al igual que la expresión del CAR no afecta a la edición genómica de PD-1.

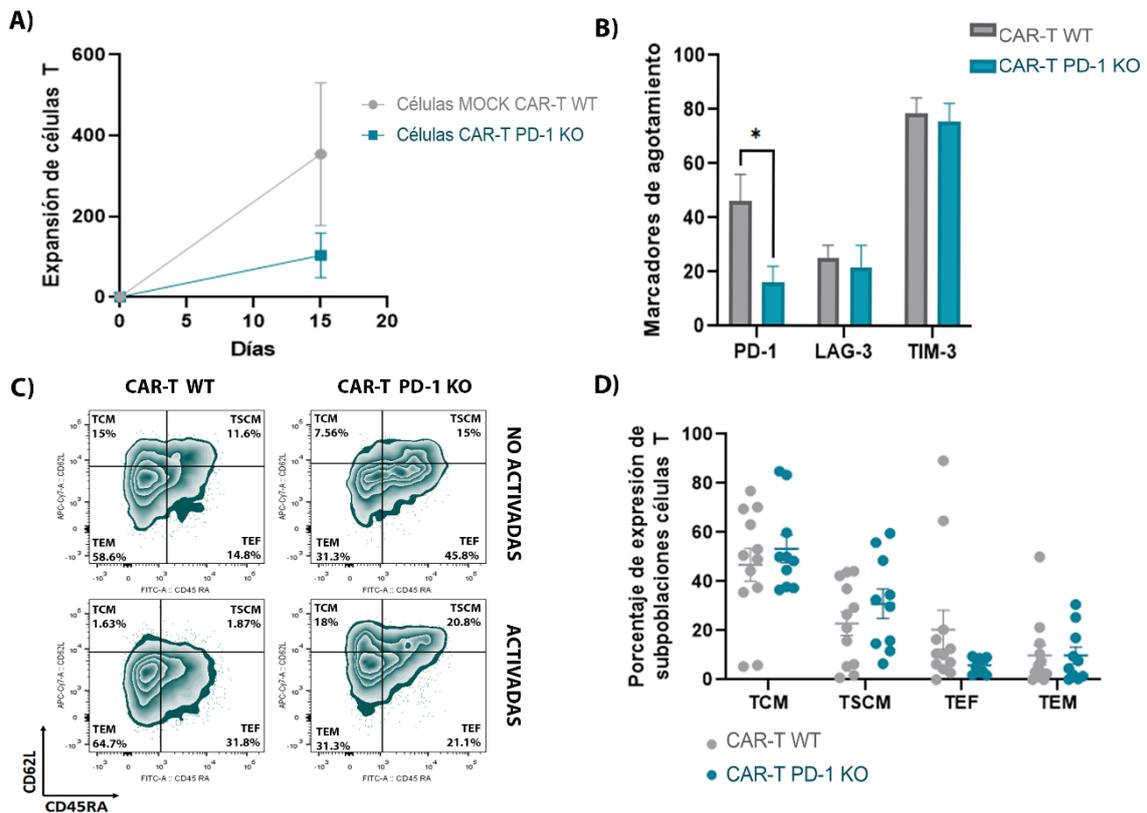
Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico desarrollado es un T-test pareado de una cola.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO ANTES DE SER ENFRENTADAS AL TUMOR: PROLIFERACIÓN, FENOTIPO Y METABOLISMO

### 2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y FENOTIPO DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO

Uno de los aspectos que define el estado de las células CAR-T es su capacidad proliferativa. Por lo tanto, decidimos determinar el potencial de expansión de las células CAR-T PD-1 KO tras estimulación  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28 durante tres días, comparadas con las células CAR-T sin editar. Como se puede observar en la **Figura 22A**, las células CAR-T PD1-KO muestran una capacidad de expansión reducida 3.44 veces respecto a las células CAR-T WT electroporadas (Mock), por lo que la electroporación no está afectando a la capacidad proliferativa de las células CAR.

Otro aspecto clave de la edición de PD-1 es su potencial para favorecer un fenotipo menos agotado en las células CAR-T PD1-KO y una mejor progresión antitumoral. Sin embargo, nuestros estudios revelan que las células CAR-T PD1-KO sólo muestran una bajada significativa en la expresión de PD-1 (16.01%) en comparación con las células CAR-T WT (46.3%). Mientras que en el caso de TIM-3 y LAG-3 no se ven diferencias significativas: La expresión de LAG-3 en células CAR-T PD-1 KO es de un 22%, frente a un 25.5% de las células CAR-T WT. La expresión de TIM-3 en células CAR-T PD-1 KO es de un 75.7% respecto a un 79% en células CAR-T WT (**Figura 22B**). En la misma dirección, cabe esperar que, si se elimina la expresión de un RI, el fenotipo o subpoblaciones de estos linfocitos T editados se verán favorecidos hacia poblaciones menos efectoras y más memoria [7]. Como se puede observar en la **Figura 22C/D**, las células CAR-T PD-1 KO activadas presentan una tendencia a inducir las poblaciones  $T_{CM}$  (WT= 44.4 a KO= 54) y  $T_{SCM}$  (WT = 21.1 a KO = 32.5) mientras que las  $T_{EF}$  disminuyen desde una media en células CAR-T WT de un 20.4% hasta un 5.21% en las CAR-T PD-1 KO y en el caso de las  $T_{EM}$ , no presentan variación, de un 10.5% en las células CAR-T WT hasta un 9.52% en las células editadas.



**Figura 22.** Las células CAR-T PD-1 KO muestran inducción hacia poblaciones memoria, pero no una reducción en los marcadores de agotamiento ni mayores capacidades proliferativas tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.

**A)** Gráfica que muestra la capacidad de expansión de tres donantes independientes editados para el gen *PDCD1* o no en células CAR-T. En los tres casos, las células CAR-T PD-1 KO presentan una capacidad de expansión disminuida comparada con las células CAR-T WT ( $p$  valor = 0,02475).

**B)** Estudio de los marcadores de agotamiento celular. Las células CAR-T PD-1 KO muestran una disminución significativa únicamente en la expresión de PD-1 ( $p$  valor = 0,031), pero no presentan cambios en la expresión de LAG-3 ni TIM-3 ( $n=6$ ) respecto a las células CAR-T WT.

**C, D)** Estudio inmunofenotípico de las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO. Las subpoblaciones fenotípicas se separan según la expresión de los marcadores de superficie CD62L y CD45RA. **C)** Gráficos de citometría representativos de la variación de las subpoblaciones de linfocitos T, donde las células CAR-T PD-1 KO presentan un incremento en las poblaciones memoria tras activación. **D)** Gráfica que muestra, con un  $N = 11$  cómo las células CAR-T PD-1 KO presentan una tendencia a incrementar las poblaciones memoria  $T_{CM}$  ( $p$  valor = 0,171) y  $T_{SCM}$  ( $p$  valor = 0,1231) y tendencia a disminuir las poblaciones  $T_{EF}$  ( $p$  valor = 0,1995) respecto de las células CAR-T WT tras estimulación  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.

Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico desarrollado es un T-test pareado de una cola.

## 2.2.2. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO

Además de estudiar las características fenotípicas y proliferativas de estas células, decidimos realizar un estudio metabólico de las mismas para tratar de entender los resultados contradictorios obtenidos entre capacidad proliferativa y fenotipo de las células CAR-T PD-1 KO tras activación celular.

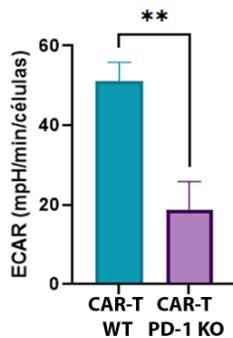
Si estudiamos la tasa de ECAR, un indicador de la energía glucolítica, de las células T activadas, vemos que las células CAR-T PD-1 KO presentan una disminución significativa de la misma (18.88) en comparación con las células CAR-T WT (51.05) (**Figura 23A**). Estos resultados nos sugieren que la respiración celular podría estar virando hacia la ruta FAO en las células CAR-T PD-1 KO, característica de las células  $T_M$ , datos que concuerdan con los resultados anteriores mostrados en la **Figura 23 C y D**. A continuación, estudiamos la fuga de protones (**Figura 23B izquierda**) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (**Figura 23B centro**) derivadas de la actividad mitocondrial en la cadena de transporte de electrones (fosforilación oxidativa, OXPHOS). Ambos indicadores mostraron una disminución en la población celular CAR-T PD-1 KO. Dado que las poblaciones de células  $T_M$  dependen más de la fosforilación oxidativa para generar ATP, estos datos parecen indicar que las células editadas para PD-1 presentan una actividad metabólica reducida. Seguidamente se estudió la capacidad respiratoria disponible (SRC), que mide la capacidad respiratoria disponible de la mitocondria para la producción de energía, y da una idea sobre el estado bioenergético de las células T. En línea con los datos anteriores, la SRC se vio reducida a la mitad en las células editadas (**Figura 23B derecha**). Estos datos sugieren, que a pesar de presentar un fenotipo memoria, las capacidades proliferativas y de longevidad de las células CAR-T PD-1 KO se ven afectadas.

Finalmente, estudiamos la capacidad de generar energía celular en forma de ATP mediante los dos mecanismos principales: a través de la vía glucolítica (glycoATP, negro) o a través de la vía mitocondrial (mitoATP, naranja) (**Figura 23C**). Las células editadas para PD-1 presentan una disminución en su capacidad de generar energía a nivel mitocondrial de cinco veces (34.35 pmol/min/células) respecto a las células CAR-T WT (179.5 pmol/min/células), y unas tres veces menos a nivel glucolítico (136.87 respecto a 407.64 de las células CAR-T WT).

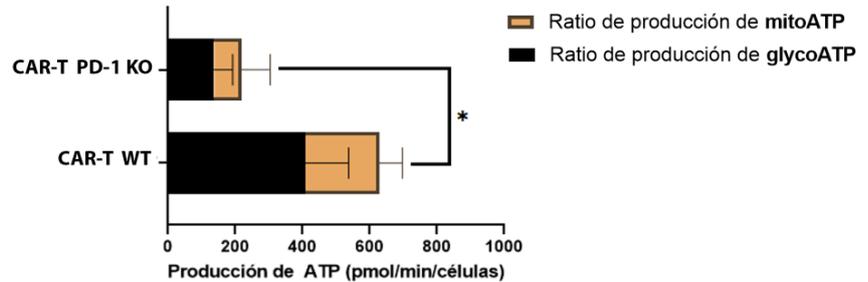
En resumen, la edición de PD-1 también conlleva efectos negativos colaterales para las células T como una menor capacidad proliferativa en ausencia de PD-L1+ y una reducción de la actividad mitocondrial, lo que sugiere una desventaja bioenergética en comparación con las células no editadas, a pesar de una inducción de subpoblaciones memoria. Es por esto que esta estrategia

debe ser mejorada con la expresión adicional de ciertas moléculas que sean capaces de revertir estos efectos metabólicos negativos al inhibir la expresión de PD-1.

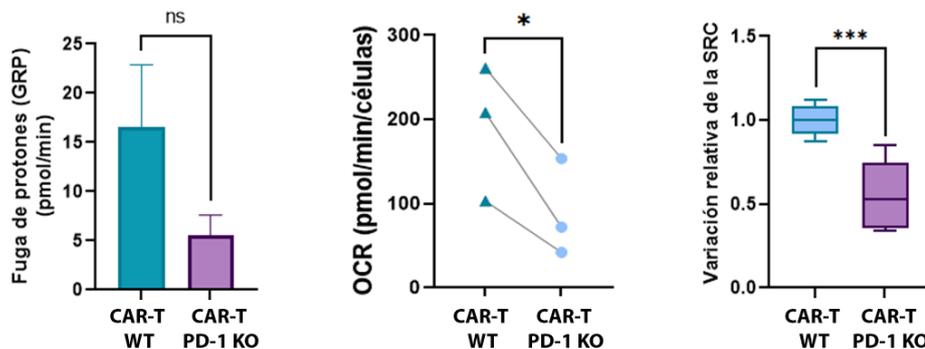
### A) Respiración celular



### C) Capacidad energética



### B) Respiración mitocondrial



**Figura 23. Las células CAR-T PD-1 KO muestran características metabólicas memoria, pero una peor capacidad respiratoria disponible tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.**

**A)** Evaluación de la glucólisis mediante la medición de la tasa de acidificación extracelular (ECAR). Los datos revelan una disminución significativa en ECAR en células CAR-T PD-1 KO en comparación con las células CAR-T WT (n=4, p valor = 0,0098).

**B)** Análisis de la Respiración mitocondrial estudiando la fuga de protones, tasa de consumo de oxígeno (OCR) y capacidad respiratoria disponible (SRC). Con un n=3, las células CAR-T PD-1 KO presentan una menor tasa de fuga de protones, pero no significativa (P valor = 0.061 (**izquierda**)), un menor consumo de oxígeno que las células CAR-T WT (p valor = 0,0042) (**centro**) y una disminución significativa de la SRC respecto de las células WT (p valor = 0.0003) (**derecha**).

**C)** Medición de la tasa de producción de ATP, tanto mitocondrial (**mitoATP, naranja**) como glicolítica (**glycoATP, negro**). La producción de glycoATP disminuye en células CAR-T PD-1 KO en comparación con las células CAR-T WT (n=4, p valor = 0,0214). La producción de mitoATP también disminuye en las células CAR-T PD-1 KO en comparación con las células CAR-T WT, pero en este caso, no es significativa (n=4, p valor = 0,0501).

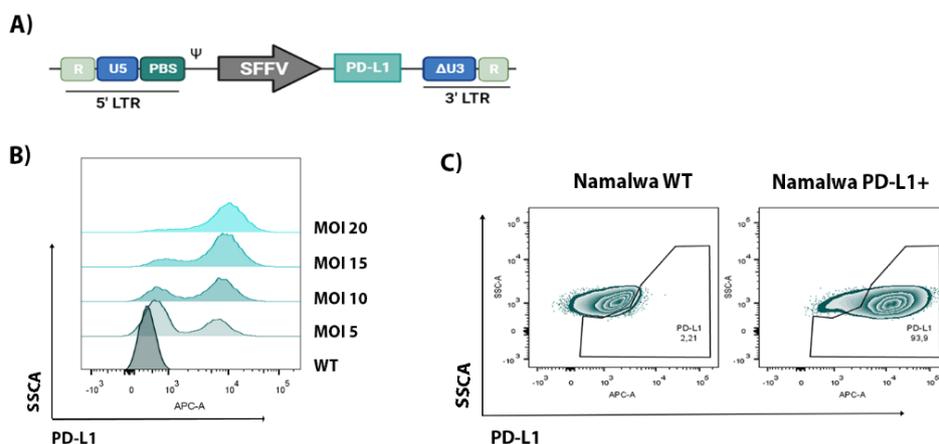
Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico desarrollado es un T-test pareado de una cola.

### 3. ACTIVIDAD LÍTICA DE LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO FRENTE A CÉLULAS TUMORALES PDL1+

Una vez puesto a punto la técnica de eliminación de PD-1 y caracterizadas las células editadas, el siguiente paso fue determinar si su actividad lítica frente a células tumorales que expresen PD-L1. Para realizar estos estudios, necesitamos enfrentar las células CAR-T PD-1 KO con células tumorales CD19+PDL1+ y las líneas control, CD19+PDL1-. Partiremos de la línea celular Namalwa CD19+ (modificadas previamente para expresar eGFP-NLuc) disponible en el laboratorio, una línea derivada de linfoma de Burkitt humano y que no expresa PD-L1. Para obtener la línea CD19+PDL1+ se procedió a generar vectores lentivirales expresando PD-L1 y a la posterior AG de las células Namalwa.

#### 3.1. GENERACIÓN DE UN MODELO CELULAR DONDE INVESTIGAR EL EJE PD-1/PD-L1 EN EL ÁMBITO DE LA TERAPIA CAR

Para generar la línea Namalwa CD19+PD-L1+ diseñamos, en primer lugar, vectores lentivirales que contuvieran el gen de PD-L1 expresado bajo un promotor constitutivo viral, SFFV (SPDL1-VLs, **Figura 24 A**). A continuación, se produjeron los vectores lentivirales tal y como se describe en materiales y métodos y se transdujeron las células Namalwa WT en diferentes condiciones de multiplicidad de infección (**Figura 24B**). Decidimos utilizar la línea más expresora de PD-L1, transducida con un MOI de 20 puesto que presentaba alrededor de un 100% de expresión de PD-L1 (**Figura 24C**) y, por tanto, debían ser altamente inmunosupresoras.



**Figura 24. Generación y caracterización de líneas celulares tumorales Namalwa PD-L1+.**

**A)** Esquema representativo del vector lentiviral utilizado para expresar PD-L1 en las células Namalwa CD19+.

**B)** Histograma representando la expresión de PD-L1 de células Namalwa transducidas con vectores lentivirales a diferentes MOI.

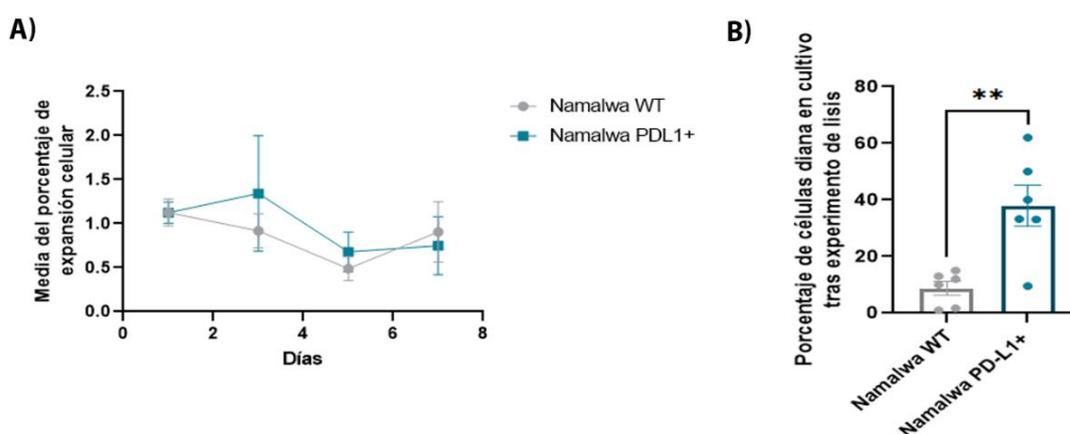
**C)** Gráfico de citometría mostrando la expresión de PD-L1 en el modelo generado con el MOI 20, seleccionado para realizar los estudios de lisis.

## 3.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO GENERADO NAMALWA PD-L1+

### 3.2.1. IN VITRO

Una vez seleccionamos el modelo a utilizar en los experimentos de lisis, quisimos caracterizarlo *in vitro* en términos de expansión celular y persistencia frente a la lisis mediada por las células CAR-T. En cuanto a términos de expansión, y al contrario a lo observado en algunos tipos de células tumorales, no apreciamos diferencias significativas entre las células Namalwa WT y Namalwa PD-L1+, presentando ambos modelos un patrón de expansión similar entre ellos (Figura 25A).

Tal y como era esperable, los experimentos de lisis con los modelos de células Namalwa frente las células CAR-T WT, mostraron una disminución significativa de la capacidad lítica de estas células CAR-T cuando son enfrentadas a células PD-L1+ en comparación con las Namalwa WT (se mantiene en el co-cultivo un 37.39% de células diana PD-L1+ frente al 8.79% de las células diana WT) (Figura 25B).



**Figura 25. Caracterización *in vitro* de líneas celulares tumorales Namalwa PD-L1+.**

**A)** Capacidad proliferativa de las líneas celulares Namalwa PD-L1+ (línea azul) en comparación con las células Namalwa WT (línea gris) (n=4). Gráficos mostrando el incremento del porcentaje de las líneas de estudio en el cultivo celular respecto a la medida anterior.

**B)** Gráfica representando el porcentaje de las células diana en el cultivo. La expresión de PD-L1 confiere propiedades de resistencia frente a la lisis mediada por las células CAR-T (n=6, p valor=0,0017).

Las células Namalwa WT, como se señala en M&M, expresan eFGPNLUc, por lo que su seguimiento *in vitro* se ha realizado siempre mediante el estudio del porcentaje de expresión de eGFP.

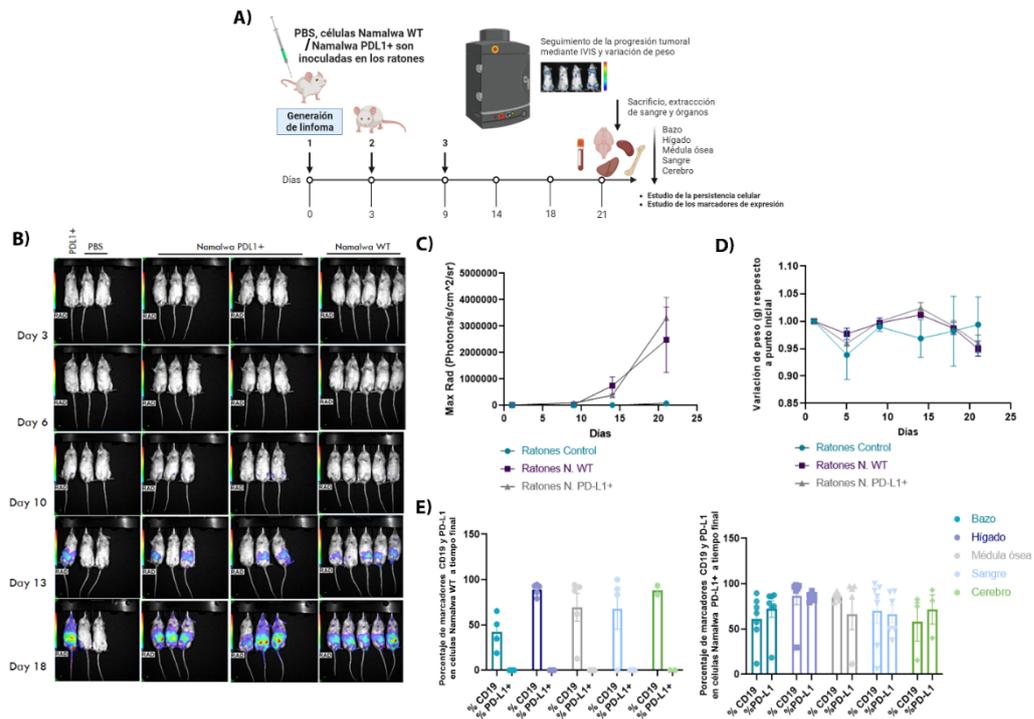
Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico desarrollado es un T-test pareado de una cola.

### 3.2.2. IN VIVO

A continuación, se procedió a realizar una comparativa de la capacidad de generación de tumores en modelos murinos de las células Namalwa PDL1+ frente a las Namalwa WT. Para ello, las células control (Namalwa WT), las Namalwa PD-L1+ y PBS (para generar el grupo control) se inocularon vía intravenosa (IV) en la cola de los ratones para la generación del modelo de linfoma (**Figura 26A**). La progresión tumoral se estudió mediante el seguimiento de la expresión de nanoluciferasa (expresada por las células tumorales) por bioluminiscencia (ver M&M), junto con la pérdida de peso de los ratones. Ambas líneas celulares mostraron patrones muy similares tanto en progresión tumoral (**Figura 26 B y C**) como en pérdida de peso (**Figura 26D**), evidenciando que la expresión de PD-L1 no afecta a la tumorigenicidad de las células Namalwa en este contexto.

Para finalizar, analizamos los niveles de expresión de CD19 y PD-L1 en las células tumorales, para comprobar si durante la expansión *in vivo* se produce silenciamiento de la expresión de algún marcador. La **Figura 26E** muestra como, tanto las células Namalwa WT (**izquierda**) como las PD-L1+ (**derecha**), presentan expresión de CD19 en los cuatro de los cinco órganos estudiados (hígado, médula ósea, sangre y cerebro) a tiempo final excepto en el bazo. De igual manera, no se aprecia silenciamiento de PD-L1 en el nuevo modelo generado a tiempo final excepto en médula ósea y en sangre en algunos ratones.

Debido a que no se aprecian diferencias significativas entre la progresión tumoral entre ambos modelos, podemos concluir que las células Namalwa y Namawa PD-L1 son un buen modelo para estudiar intervenciones terapéuticas sobre el eje PD-1/PD-L1.



**Figura 26. Caracterización *in vivo* de líneas celulares tumorales Namalwa PD-L1+.**

Se inocularon 300000 células Namalwa WT o células Namalwa PD-L1 en catorce ratones NGS. Se siguió la progresión del tumor siguiendo el flujo de trabajo que se muestra en el apartado **A**.

**B)** Estudio de la progresión del tumor mediante bioluminiscencia en IVIS.

**C)** Estudio cuantitativo de la progresión del tumor y del peso de los ratones **D)** a lo largo del experimento.

**E)** Expresión de PD-L1 y CD19 en cinco tejidos diferentes (bazo, hígado, médula ósea, sangre y cerebro) a tiempo final del experimento.

Las células Namalwa WT, como se señala en M&M, expresan eGFPNLuc, por lo que su seguimiento *in vivo* se ha realizado siempre estudiando la señal de bioluminiscencia derivada de la luciferasa al reaccionar con el reactivo Nano-Glo<sup>®</sup>, infundido intraperitonealmente minutos previos a la adquisición.

Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. La estadística se basa en un test Mann-Whitney de dos colas.

### 3.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA, FENOTIPO Y PERSISTENCIA DE CÉLULAS CAR-T PD-1 KO Y CÉLULAS CAR-T WT FRENTE A CÉLULAS NAMALWA PD-L1+

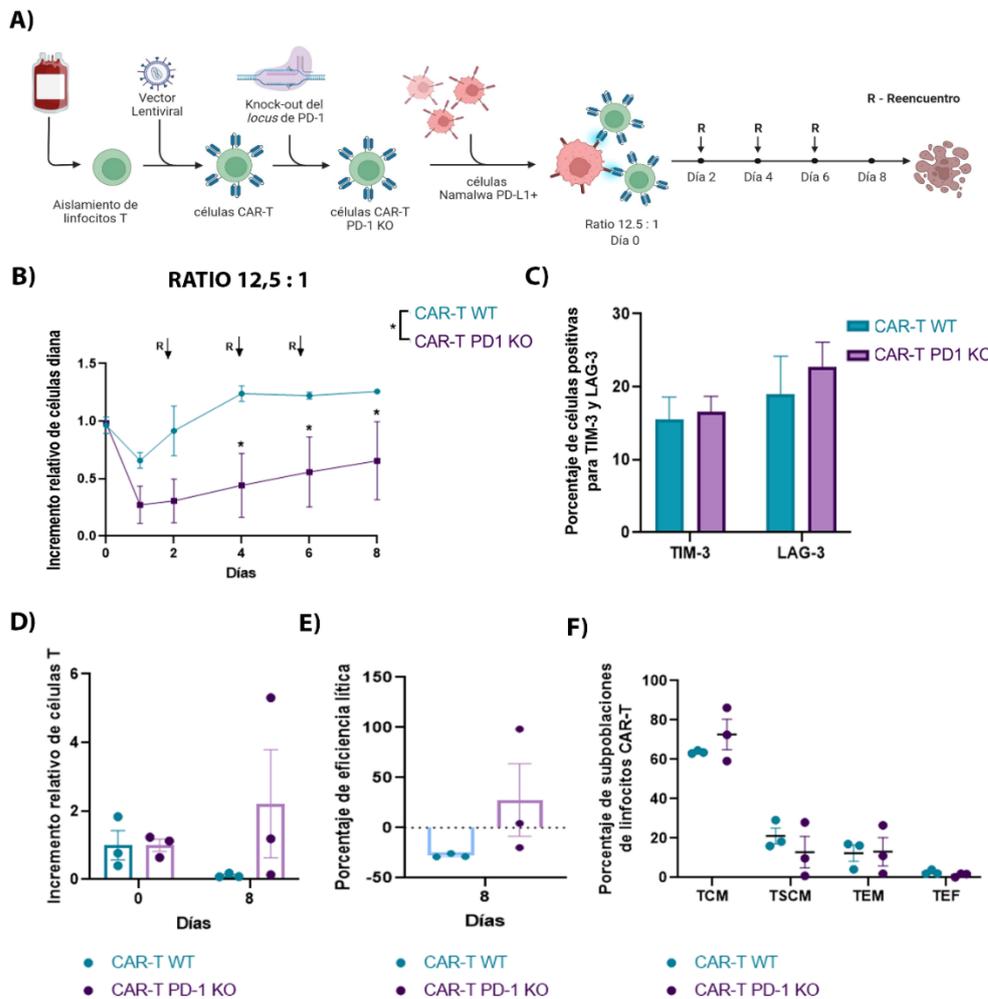
Tras generar las células CAR-T PD1-KO, realizamos estudios de su capacidad lítica frente a células tumorales diana expresando el ligando para PD-1. Se realizaron tres experimentos de lisis con células T obtenidas a partir de tres donantes sanos diferentes, transducidos con MOI de 10 para expresar el CAR y editados para el *locus PDCD1*, cultivados en una ratio de 12.5:1 (D:E\_CAR) con Namalwa PD-L1+ como células diana en medio RPMI. Para estresar aún más el sistema, diseñamos un experimento de estimulación repetida en el que las células CAR-T, fueron enfrentadas cada 48h con nuevas células Namalwa PD-L1+ a un ratio D:E\_CAR 12.5:1 con un total de 4 encuentros (R, de *rechallenge* o reencuentro) (**Figura 27A**).

El seguimiento de las células diana en cultivo se ve representado en la **Figura 27B**, donde se realiza el estudio cada 48h. Las células CAR-T PD-1 KO presentan una capacidad lítica de las células Namalwa PD-L1+ mejorada en comparación con las células CAR-T WT tras tres reencuentros con las células diana. Tras el primer reencuentro de las células CAR-T WT, la lisis deja de ser efectiva, presenciando un claro escape tumoral en los tres donantes (el incremento de las células diana oscila desde un 0.66 a día 1 hasta un 1.26 a día 8). En cambio, las células CAR-T PD-1 KO son capaces de mantener la capacidad lítica tras tres reencuentros con las células diana (desde un 1 a día 0, hasta un 0.66 de incremento celular de la línea Namalwa PD-L1+ a día ocho tras cuatro encuentros).

La **Figura 27C** muestra cómo los marcadores de agotamiento (TIM-3 y LAG-3) se expresan en ambas condiciones a tiempo final del experimento, incluso presentan una tendencia a incrementar tanto TIM-3 (15.55% en células CAR-T WT y 16.6% en CAR-T PD-1 KO) como LAG-3 (18.97% en células CAR-T WT frente a 22.7% en células CAR-T PD-1 KO).

La consecuencia más directa de la eliminación de PD-1 debería ser la mejora en persistencia celular al ser enfrentadas a células PD-L1+, tal y como ha sido publicado previamente por varios autores. La **Figura 27D** muestra la persistencia de las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO a punto final del experimento de lisis donde muestra una clara tendencia a mejorar la persistencia de las células CAR-T editadas, incrementando desde 1 a día cero hasta una media de 2.21 a día ocho. En cambio, las células CAR-T WT presentan una disminución de la persistencia, desde 1 a día cero hasta 0.18 a día ocho. Cada donante muestra un comportamiento diferente, sugiriendo la necesidad de realizar más repeticiones biológicas. En consonancia con estos datos, la **Figura 27E** destaca un incremento en la capacidad lítica de las células CAR-T PD-1 KO respecto de las células CAR-T enfrentadas a Namalwa PD-L1+.

En cuanto a las características fenotípicas de las mismas, cabe esperar que las células editadas para PD-1 presenten unas características más memoria. La **Figura 27F** muestra el estudio inmunofenotípico de las células editadas y no editadas a punto final del experimento; las células CAR-T PD-1 KO presentan una tendencia a aumentar la población  $T_{CM}$  (73.5%) respecto a las células CAR-T WT (64%), pero no las  $T_{SCM}$ . En cuanto a las poblaciones efectoras no se aprecian diferencias significativas entre las células CAR editadas y no, sugiriendo que, a una mayor eficiencia de lisis (2X), las células CAR-T PD-1 KO presentan una mayor población  $T_{CM}$  y no presenta disminución en las poblaciones efectoras en comparación con las células CAR-T WT.



**Figura 27. Las células CAR-T PD-1 KO muestran una mayor capacidad lítica que las células CAR-T WT frente a las células diana PD-L1+.**

**A)** Flujo de trabajo del ensayo de lisis realizado. Se co-cultivaron 25000 células Namalwa PD-L1+ frente a 10000 células CAR-T y CAR-T PD-1 KO, expresando alrededor de un 20% de CAR. Por tanto, el ratio establecido en el co-cultivo (D:E\_CAR) es de 12.5:1, donde son enfrentadas 12.5 células Namalwa PD-L1+ (D) frente a una molécula CAR (E\_CAR).

**B)** Incremento relativo de células diana respecto del día inicial. Gráfico que muestra la lisis de células Namalwa PD-L1+ mediada por células CAR-T WT y PD-1 KO en una ratio 12.5:1. Estudiando las diferencias del número de células diana en el cultivo en el punto final (día 8) y tras cuatro encuentros con las células diana, se observa en un n=4 que las células CAR-T PD-1 KO presentan una capacidad lítica mejorada respecto de las células CAR-T WT (p valor = 0,0254).

**C)** Porcentaje de expresión de los marcadores de agotamiento TIM-3 y LAG-3 a tiempo final del experimento. El gráfico muestra cómo las células CAR-T PD-1 KO tienden a expresar un mayor porcentaje de TIM-3 en comparación con las células CAR-T WT (n=4, valor de p =0,4371) además de una tendencia en el aumento de la expresión de LAG-3 en comparación con las células CAR-T WT (n=4, valor de p =0,3181).

**D)** Gráfica mostrando la persistencia de las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO a punto final del experimento de lisis medido como el incremento del porcentaje final respecto del porcentaje celular a tiempo inicial en el co-cultivo. Las células CAR-T PD-1 KO presentan un aumento significativo en su capacidad de persistencia, tanto respecto a día 0 (n=3, p valor = 0,02516) como respecto a las células WT a tiempo final (n=3, p valor = 0,1593).

**E)** Gráfica mostrando el porcentaje de lisis en las células de estudio. Las células CAR-T PD-1 KO muestran un incremento significativo en su capacidad lítica (n=3 p valor = 0,1340) frente a las células CAR-T WT. El porcentaje de lisis se calcula como se describe en M&M.

**F)** Gráfico que muestra la distribución de las subpoblaciones fenotípicas de células T distribuidas en función del porcentaje de expresión de los marcadores de superficie CD62L y CD45RA. Las células CAR-T PD-1 KO muestran una tendencia a incrementar las subpoblaciones T<sub>CM</sub> (p valor = 0,1737), a disminuir las T<sub>SCM</sub> (p valor = 0,2503) y a mantener las poblaciones efectoras en comparación con las células CAR-T WT tras ocho días de experimento y cuatro encuentros con las células diana.

Las gráficas muestran la media ± SEM. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de una cola.

## 4. DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA GENERAR CÉLULAS CAR-T PD-1 KO SECRETORAS DE IL-15 TRAS ACTIVACIÓN

Hemos visto que la edición de PD-1 en células CAR-T es capaz de mejorar la capacidad lítica frente a células tumorales que expresan su ligando, sugiriendo que son capaces de evadir la supresión mediada por el TME [299]. Por otro lado, también hemos visto que la edición de PD-1 en estas células T da lugar a efectos contradictorios en las mismas, como una menor capacidad proliferativa o una reducción de la SRC. Esto sugiere que las células PD-1 KO presentan un peor *fitness* comparado con las células WT a pesar de la tendencia a mejorar las subpoblaciones memoria. Como se ha comentado anteriormente, la IL-15 emerge como un candidato prometedor para mantener o incrementar el fenotipo memoria de las células T CD8+ debido a su papel crítico en la regulación de la bioenergética y el metabolismo de las células T. Por tanto, cabe esperar que, la expresión de esta citocina en las células CAR-T confiera una mayor persistencia y capacidad lítica. En base a esto, se procedió a diseñar una estrategia de KI en la que simultáneamente se elimina la expresión de PD-1 y se expresa IL-15 de forma controlada. Para ello, en primer lugar, se procedió a la optimización del protocolo para generar inserciones específicas en las células T primarias mediante recombinación homóloga (HDR).

### 4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA INSERCIÓN ESPECÍFICA DE ADN EN LOCUS ESPECÍFICOS DE CELULAS T (KI)

Para esta optimización se utilizó un donador (v6\_eGFPTRAC) y un locus diana (*TRAC*) que nos permitiera analizar fácilmente la eficacia de inserción sitio-específica, *on-target*. Con esta finalidad se diseñó el donador mostrado en la **Figura 28A** que expresa eGFP a través del promotor SFFV, y flanqueado de brazos de homología para el locus *TRAC*.

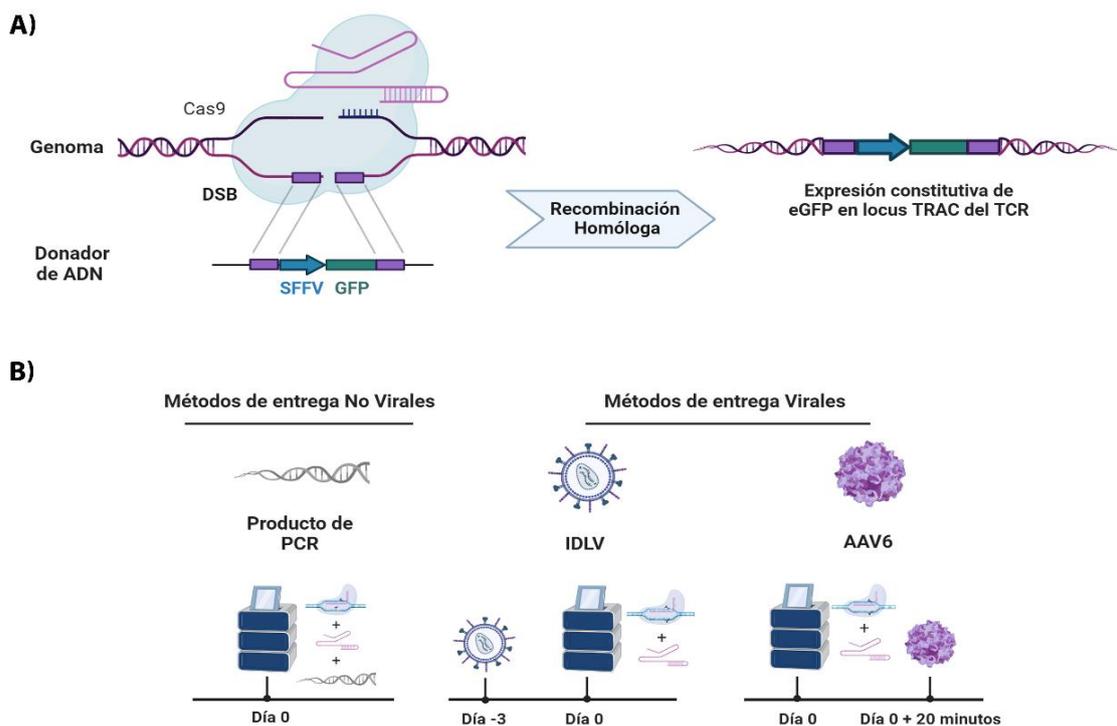
#### 4.1.1. COMPARATIVA DE MÉTODOS DE ENTREGA DEL ADN DONADOR

Como se ha descrito en el apartado de terapia génica, existen dos tipos de vectores para transferencia génica, los virales y los no virales. Actualmente, los vectores virales más utilizados para entregar un ADN donador a la célula diana son los AAV6, aunque los IDLVs están cogiendo protagonismo en base a trabajos recientes del grupo del Prof. Naldini [175]. En la misma dirección, otros estudios indicaban la posibilidad de utilizar ADN lineal como método de entrega. En base a esto, procedimos en primer lugar a comparar ambos vectores virales junto con la electroporación del producto de PCR como ADNdc.

Para realizar esta comparativa decidimos editar el locus *TRAC* del TCR debido a que esta edición es más fácil de detectar ya que el TCR mantiene una expresión constante en comparación con la

expresión de PD-1. Además, como prueba de concepto, utilizamos un ADN donador que contenía eGFP situado aguas abajo del promotor viral SFFV y flanqueado por dos brazos de homología para favorecer la recombinación homóloga (**Figura 28A**). De este modo, tras la formación de DSB en el locus *TRAC*, el transgén se insertará gracias al mecanismo de HDR y se expresará eGFP de manera constitutiva bajo el promotor SFFV.

Como se puede ver en la **Figura 28B**, cada método de entrega requiere de un proceso diferente debido a su naturaleza; (1) en el caso del producto de PCR, se entrega el ADN donador junto con la RNP, (2) En el caso de los IDLVs, primero las células son transducidas con los vectores virales y, tres días después de la transducción, cuando se estima que se ha formado el mayor número de episomas virales en las células, se electroporan con la RNP (3) por el contrario, en el caso de los AAV6 no es necesario esperar ningún proceso viral previo por lo que 20 minutos tras la formación de poros en las membranas celulares y las DSB en el locus *TRAC*, las células se transducen con los vectores virales para que se lleve a cabo la HDR.



**Figura 28. Esquema representativo de las estrategias de knock-in para edición genómica.**

**A)** Esquema que muestra la estrategia de recombinación homóloga (HDR) del transgén (eGFP) gracias a la generación de DSB mediante la endonucleasa CRISPR/Cas9 y la presencia de brazos de homología (**izquierda**) en el locus *TRAC*. A la **derecha** se muestra una representación del genoma editado en aquellas células en las que hayan introducido mediante HDR el transgén en el locus *TRAC*.

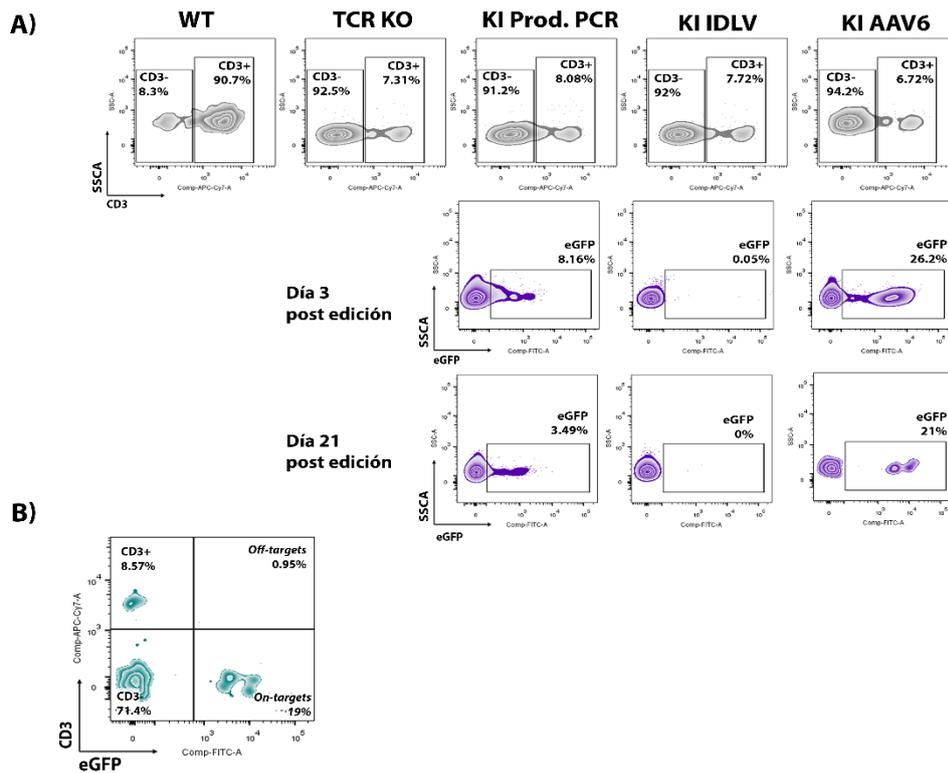
**B)** Representación del protocolo utilizado en base al vector de entrega utilizado en la estrategia de *Knock-In* (KI).

Imagen creada con BioRender.com.

Para estudiar el porcentaje de integración del transgén nos basamos, en la población negativa para CD3 (ya que eliminando la expresión del TCR eliminamos la expresión de CD3). Dentro de esa población editada, estudiamos los porcentajes de expresión de eGFP debidos al donador integrado. Como se observa en la **Figura 29A**, las estrategias utilizadas no afectan a la eficiencia de edición del TCR, con una eficiencia media del 90%. La expresión de eGFP tres días tras la edición fue de un 8.16% en el caso del producto de PCR como ADN donador, de un 0.05% en el caso de los IDLVs y de un 26.2% en el caso de los AAV6.

Pasados 21 días de la edición, las células editadas han realizado las divisiones celulares necesarias para que los episomas virales que se quedaron en el núcleo tras la transacción y no fueron integrados en el genoma, hayan desaparecido. Por lo tanto, se volvieron a estudiar los niveles de expresión de eGFP en estas células y observamos un 3.49% en las células editadas con el producto de PCR, un 0% en el caso de las células editadas con IDLVs y un 21% en las células editadas con AAV6. Los niveles de expresión se han reducido a la mitad con el uso de producto de PCR, mientras que con los AAV6 apenas se han modificado y la población positiva para eGFP se ve muy bien definida, sugiriendo que las integraciones han sido bien consolidadas (**Figura 29A**).

Según el diseño de los donadores, de ocurrir HDR en el locus *TRAC*, se debe de eliminar la expresión de este gen y, en consecuencia, también la de CD3. Es por esto, que la generación de células CD3- y eGFP+ serán indicativo de la eficacia de KI de nuestro donador en el locus *TRAC* (*on-target*). Sin embargo, la aparición de células CD3+ y eGFP+ indicaría que el donador se ha integrado en otras regiones del genoma fuera del locus diana (*off-target*). La **Figura 29B** muestra un total de un 19% de integraciones *on-target* y ninguna integración *off-target*. Por lo tanto, según estos datos, el uso de AAV6 sería la plataforma de elección para entregar donadores ADN en las futuras estrategias de KI para las células T.



**Figura 29. Eficiencia de integración de cada vector de entrega utilizado en el estudio.**

**A)** Gráficos de citometría que representan los niveles de edición del locus *TRAC* del TCR en la parte **superior**. La parte **inferior** muestra los niveles de expresión de eGFP, determinados por la integración del transgén bajo el promotor viral SFFV pertenecientes a las poblaciones CD3-. Se realizaron medidas a día 3 y 21 tras la edición para determinar la expresión de eGFP debido a las integraciones finales en el genoma tras varios ciclos de división celular.

**B)** Gráfico representativo del porcentaje de integraciones en el sitio diana (*on-target*) y fuera del mismo (*off-target*) 21 días tras la edición con AAV6 como vector de entrega. Este análisis proporciona una visión detallada de la eficiencia y especificidad de integración del vector de entrega en el locus deseado.

#### 4.1.2. MODIFICACIONES DE LOS IDLVs PARA SU APLICACIÓN COMO VECTOR DE ENTREGA EN LA ESTRATEGIA KI

A pesar de que los resultados obtenidos muestran que los AAV6 son claramente superiores a los IDLVs para realizar la técnica de KI, las potenciales ventajas de los IDLVs en cuanto a tamaño y toxicidad [175], nos hizo plantearnos introducir modificaciones que pudieran incrementar su eficacia de entrega del ADN donador. Estas modificaciones podrían, además, servir para mejorar las características de estos IDLVs como sistema de expresión transitorio.

Nuestro grupo había demostrado previamente que la inserción en el 3'LTR del elemento IS2, formado por las secuencias cHS4 y SAR2 (**Figura 30**), reposicionaba los episomas a sitios transcripcionalmente activos, mejorando su eficiencia [305]. En base a esto, se planteó la hipótesis de que, si estos elementos son incorporados en el ARN de los IDLVs, una vez retro-transcritos a ADN, este reposicionamiento podría favorecer la recombinación homóloga del ADN donador en aquellos locus transcripcionalmente activos [305]. Con estos antecedentes, en esta Tesis se han realizado nuevas modificaciones a los IDLVs con la finalidad de mejorar sus características como plataforma de entrega de ADN donadores. Para ello es necesario preservar la expresión mejorada del transgén sin que se afectaran los niveles de episomas virales generados en las células transducidas [170].

Con esta finalidad se introdujo el elemento IS2, así como otros elementos basados en el elemento IS2 (SAR2 y cHS4) de manera individual, entre el transgén (eGFP) y el 3'LTR, como se muestra en la **Figura 30A**. Luego evaluamos su impacto en los niveles de transcripción episomal y en los rendimientos de IDLVs intracelulares en células HEK293T puesto que son el mejor modelo para estos estudios debido a que es donde mayor efecto se observa del IS2.

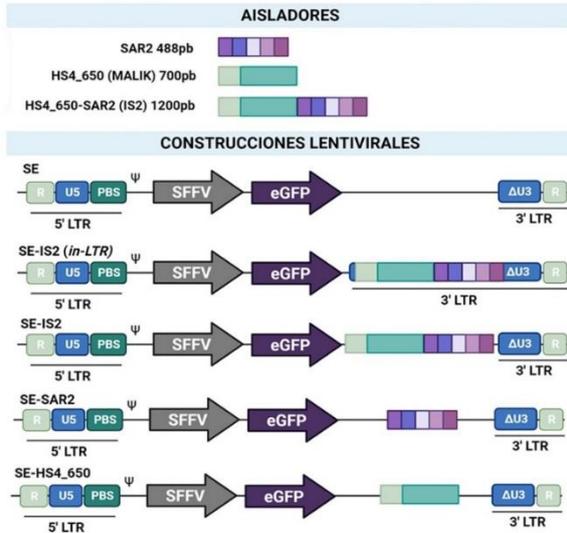
Después de producir los IDLVs conteniendo los diferentes elementos, se transdujeron células HEK293T utilizando un MOI de 0.4 (estimación basada en el Applied Biological Materials (ABM) lentiviral qPCR Titer Kit). Tres días después, analizamos los niveles de expresión de eGFP de los diferentes constructos (**Figura 30B**) en términos del porcentaje de eGFP (**Figura 30C**), intensidad media de fluorescencia (MFI; **Figura 30D**) y la cantidad de genomas virales en forma episomal en las células transducidas (**Figura 30E**). Estos estudios mostraron que la incorporación de IS2 fuera del LTR (SE-IS2) aumentó levemente los niveles de expresión del transgén, aunque mantenía el efecto negativo de reducir el número de episomas en las células transducidas (**Figura 30E**). La incorporación de cHS4 ofrecía datos aún peores, con efectos incluso levemente negativos en relación con el IDLV SE, pero sí presentaba un aumento en el número de partículas virales formadas. Por otro lado, vemos una relación entre eficiencia viral y longitud de la

secuencia aisladora introducida en el genoma viral. Los IDLVs con SAR2 fuera del LTR (SE-SAR2) aumentan tanto el porcentaje de células eGFP positivas como los niveles de expresión y sin afectar negativamente al número de episomas en las células transducidas (**Figura 30 B, C, D, E**). SE-IS2 (*in-LTR*) presenta una disminución del 60% en la formación de episomas virales (**Figura 30E**), posiblemente debido a la modificación del LTR, por lo que puede estar viéndose afectado el proceso de reverso transcripción viral. Por tanto, debido a las altas características de la secuencia quimérica, decidimos usar este aislador, pero sin modificar el LTR viral.

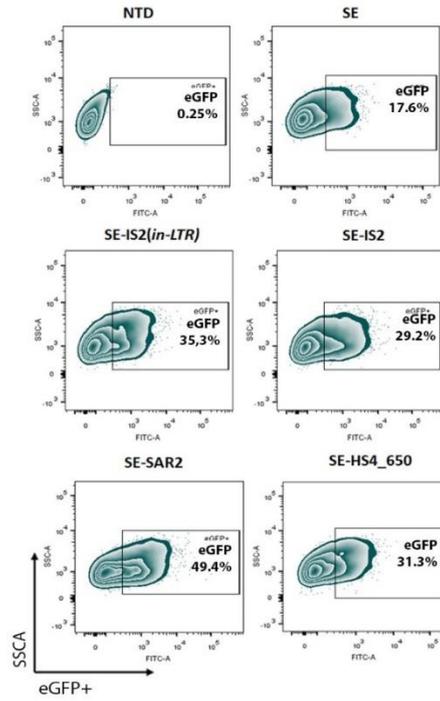
En base a esto, se procedió a analizar los IDLVs SE-IS2 y SE-SAR2 en células T (**Figuras 30 F-H**). Como se puede ver en las **Figuras 30 F y G (izquierda)** el porcentaje de expresión de eGFP en las células transducidas presenta una disminución significativa en aquellas células T transducidas con el elemento IS2 fuera del LTR. No ejerce ningún efecto sobre los niveles de expresión del transgén como muestra la gráfica de la **Figura 30G (derecha)** y, además, disminuye la capacidad de generación de partículas virales en comparación con los IDLVs SE (**Figura 30H**). En el caso de la construcción SE-SAR2, no presenta cambios significativos respecto del SE en términos de porcentaje de eGFP ni en niveles de expresión (**Figuras 30F/G**) a pesar de sí presentar un incremento en la capacidad de la formación de episomas virales en la célula (**Figura 30H**).

Por lo tanto, según estos datos, los AAV6 siguen siendo la plataforma de elección para entregar la secuencia de IL-15 humana a las células T diana en el locus *PDCD1* en los futuros experimentos de esta tesis.

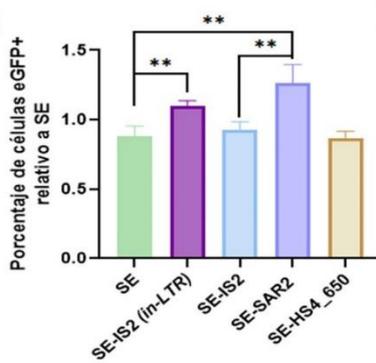
A)



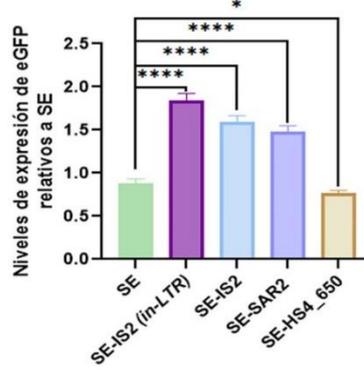
B)



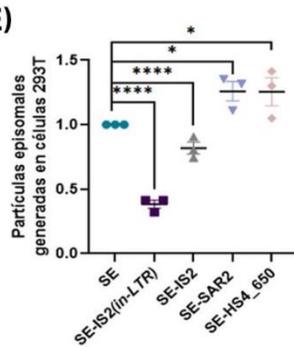
C)



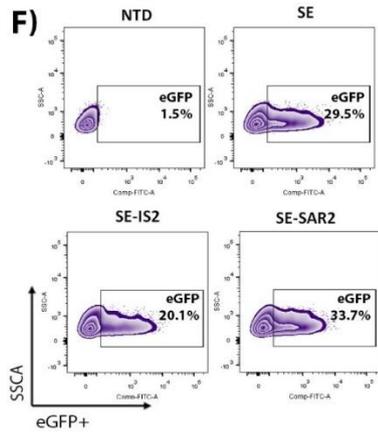
D)



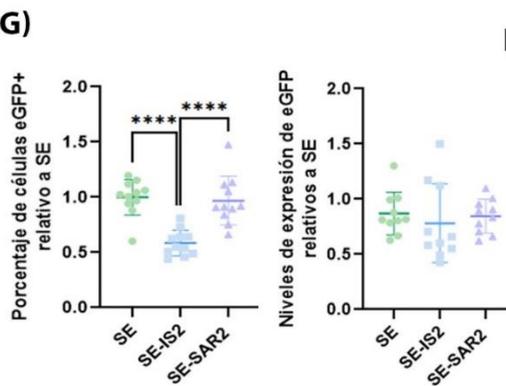
E)



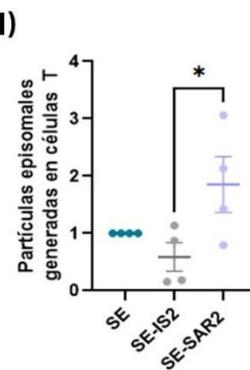
F)



G)



H)



**Figura 30. El uso de las secuencias genéticas estudiadas no mejora las capacidades de los IDLVs como vectores de entrega génica.**

**A)** Diagrama esquemático de los diferentes constructos utilizados en este estudio.

**B)** Gráficos representativos de citometría de células 293T transducidas con SE, SE-IS2 (en LTR), SE-IS2, SE-SAR y SE-HS4\_650 con un MOI = 0.4 y analizadas 72 h después de la transducción, mostrando el porcentaje de células eGFP+.

**C)** Gráficos que muestran el porcentaje de células eGFP+ y **D)** los niveles de expresión de eGFP (MFI) analizado por citometría de células 293T transducidas con los diferentes IDLV en relación con los valores para SE. En términos de porcentaje de eGFP, tanto las construcciones SE-IS2(*in-LTR*) y SE-SAR2 muestran un incremento significativo respecto de SE (p valores de 0.0028 y 0.0086 respectivamente). En cuanto al MFI, las construcciones SE-IS2(*in-LTR*), SE-IS2 y SE-SAR2 presentan un incremento de los niveles de expresión relativos a SE (p valor = <0.0001) y una disminución en el caso de SE-HS4\_650 (p valor = 0.0274).

**E)** Se muestran los episomas virales relativos a los generados con SE en las células transducidas para cada IDLV. Las construcciones con el elemento IS2, tanto dentro como fuera del LTR presentan una disminución significativa de la generación de partículas en los IDLVs de estudio respecto del control SE (p valores de <0.0001 y 0.0090 respectivamente). Los elementos SAR2 y HS4\_650 fuera del LTR presentan un incremento en la formación de episomas virales (p valor = 0.0133 y p valor = 0.0385 respectivamente) respecto del control SE.

**F)** Gráficos representativos de células T primarias transducidas con SE, SE-IS2 y SE-SAR2 con un MOI = 0.4 y analizadas 72 h después de la transducción, mostrando el porcentaje de células eGFP+ analizado por citometría.

**G)** Gráficos que muestran el porcentaje de células eGFP+ (**izquierda**) y los niveles de expresión de eGFP (MFI) (**derecha**) de células T primarias transducidas con los diferentes IDLV en relación con los valores para SE. En términos de porcentaje de eGFP, la construcción SE-IS2 muestra una disminución (p valor = <0.0001). Al contrario, SE-SAR2 muestra un incremento significativo respecto de SE-IS2 (p valor = <0.0001) pero no respecto de SE (p valor = 0.3591). En cuanto al MFI, las construcciones SE-IS2 y SE-SAR2 no presentan variación significativa respecto de SE.

**H)** Ratio de episomas virales relativos a los generados con SE en las células transducidas para cada IDLV. La construcción SE-IS2 presenta nuevamente una disminución, aunque no significativa de la generación de partículas virales respecto de SE (p valor = 0.0733). Las construcciones SE-SAR2 y HS4\_650 fuera del LTR muestran un incremento significativo en la formación de episomas virales respecto de SE-IS2 (p valor = 0.0296), pero no respecto de SE (p valor = 0.0646). respectivamente).

Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas.

## 4.2. GENERACIÓN DE CÉLULAS pdTRUCKIL-15

Una vez optimizada la generación de DSB en el locus *PDCD1* (apartado 1) y seleccionados los AAVs como la mejor plataforma para hacer KI en células T primarias, se procedió a diseñar finalmente un ADN donador que permitiera simultáneamente eliminar la expresión de PD-1 y que IL-15 se expresara siguiendo el patrón de expresión endógeno de PD-1 (**Figura 31A**). Este nuevo producto al que denominamos pdTRUCKIL-15, será capaz de expresar la citocina IL-15 sólo bajo condiciones de agotamiento y/o activación, por lo que estaríamos evitando los efectos adversos de la expresión constitutiva de esta citocina proinflamatoria.

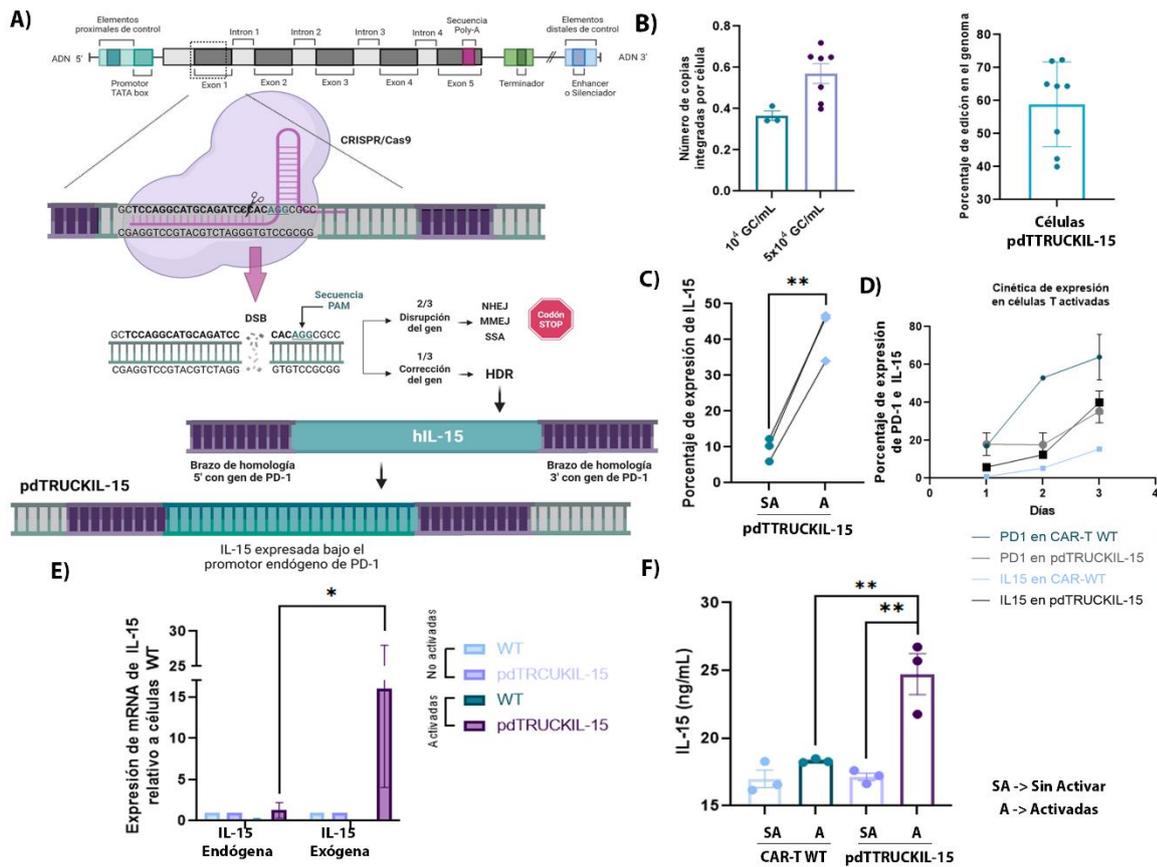
Brevemente, las células T fueron transducidas con vectores lentivirales que expresan el CAR ARI-0001, utilizando un MOI de 10 y dos días después se electroporaron con la RNP (Cas9+ARNg3). Veinte minutos tras la electroporación celular, las células son transducidas con los AAV6 v6\_IL-15PDCD1. A partir del tercer día de edición se realizan los estudios pertinentes de estas células.

El primer paso a tener en cuenta en esta estrategia de KI, es saber cuánta cantidad de vector viral entregar a las células diana para obtener una eficiencia de edición adecuada sin llegar a niveles tóxicos. Hicimos una comparativa entre dos cantidades distintas, comunes para llevar a cabo el proceso de KI con AAV6 en células primarias;  $10^4$  y  $5 \times 10^4$  GC/mL. Como se observa en la **Figura 31B izquierda**, el número de copias en el sitio específico integradas por cada célula diana es de 0.37 y de 0.57 obtenidas por *droplet digital* PCR (ddPCR) IN-OUT, (ver materiales y métodos). Una vez seleccionamos la concentración de AAV6 a usar en los experimentos de KI de IL-15, decidimos examinar qué porcentaje de edición en el genoma de la población total de células editadas se consigue mediante esta estrategia. Por tanto, como se observa en la **Figura 31B derecha**, se muestra una media de edición de un 60% en nuestras células CAR-T medida por ddPCR IN-OUT.

Como ha sido mencionado previamente, en el caso de las células pdTRUCKIL-15, únicamente deberíamos ver expresión de IL-15 cuando estas células son activadas, mimetizando el patrón de expresión de PD-1. Por tanto, se compararon los niveles de expresión de IL-15 mediante citometría de flujo en las células pdTRUCIL-15 en estado basal y tras activación (**Figura 31C**) además de su patrón de expresión con el de PD-1 (**Figura 31D**), mediante análisis de los niveles de ARNm (**Figura 31E**) y mediante ELISA (IL-15 secretada) (**Figura 31F**) tras tres días de activación celular con una nanomatriz  $\alpha$ -CD3 /  $\alpha$ -CD28.

Tal y como era esperable, se observó un incremento de expresión de IL-15 tanto a nivel de proteína (**Figura 31C**) como de ARNm (**Figura 31E**). Los datos de citometría evidenciaban que un incremento de IL-15 intracelular tras la estimulación de un 30% respecto a las células no activadas, mientras que los datos de ARNm mostraban un incremento de 16 veces tras la activación respecto a las células pdTRUCKIL-15 sin activar. En la misma dirección pudimos observar que la secreción de IL-15 incrementa tras la activación celular desde unos 17.15 hasta 24.73 ng/mL, confirmando que las células pdTRUCKIL-15 además de expresar intracelularmente IL-15, son capaces de secretarla al medio bajo el promotor endógeno de PD-1 (**Figura 31F**).

Para analizar hasta qué punto la IL-15 expresada en las células pdTRUCKIL-15 viene determinada por el promotor endógeno de PD-1, se procedió a realizar una comparativa entre la cinética de expresión de PD-1 e IL-15 en células pdTRUCIL-15 y células CAR-T WT tras activación celular. La **Figura 31D** muestra que el patrón de expresión de IL-15 exógena (línea negra) mimetiza el patrón de expresión de PD-1 (línea gris) de esta población total de células editadas (la eficiencia de edición de PD-1 es del 80%, por lo que existirá un 20% de células remanente en el cultivo que no hayan sido editadas y sí expresen PD-1).



**Figura 31. Se consigue eficacia knock-in de IL-15 junto con una expresión inducida por el promotor endógeno de PD-1 en las células T editadas tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.**

**A)** Esquema representativo de la estrategia de *Knock-in* de IL-15 en el exón 1 de *PDCD1*, mostrando la secuencia diana del ARNg3 y la secuencia PAM. La recombinación homóloga de IL-15 tendrá lugar tras la generación de DSBs y gracias a los brazos de homología de 150pb diseñados frente al locus *PDCD1*, flanqueando el sitio de corte diana para el ARNg3.

**B)** Gráfica mostrando el número de integraciones por célula (**izquierda**) con dos MOI distintos utilizados ( $4 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  GC/mL) para establecer la técnica de KI. La gráfica de la **derecha** muestra la eficiencia de edición genómica de integración de IL-15 en el genoma total analizado de células pdTRUCKIL-15.

**C)** Gráfica mostrando el incremento del porcentaje de expresión de IL-15 mediante citometría de flujo, inducida por activación celular y medida por tinción intracelular (p valor = 0.0183).

**D)** Gráfica que representa el patrón de expresión de IL-15 y PD-1 en células CAR-T WT y pdTRUCKIL-15. Se ve una clara correlación entre la cinética de la expresión de PD-1 (**línea gris**) e IL-15 (**línea negra**) en las células pdTRUCKIL-15 medida por citometría de flujo.

**E)** Expresión del ARN mensajero de IL-15 exógena en células activadas. La gráfica muestra un incremento significativo de la expresión de IL-15 exógena respecto de la IL-15 endógena tras activación celular (p valor = 0.0351), realizado por qPCR y analizada respecto a las células sin activar.

**F)** Cuantificación de IL-15 secretada al medio mediante la técnica ELISA. Las células pdTRUCKIL-15 presentan un incremento en la secreción de IL-15 tras su activación respecto de las células CAR-T WT (p valor = 0.0067) y pdTRUCKIL-15 sin activar (p valor = 0.0040).

Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de una cola.

## 4.3. CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPO, PROLIFERACIÓN Y METABOLISMO DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15 ANTES DE ENFRENTARLAS A TUMOR

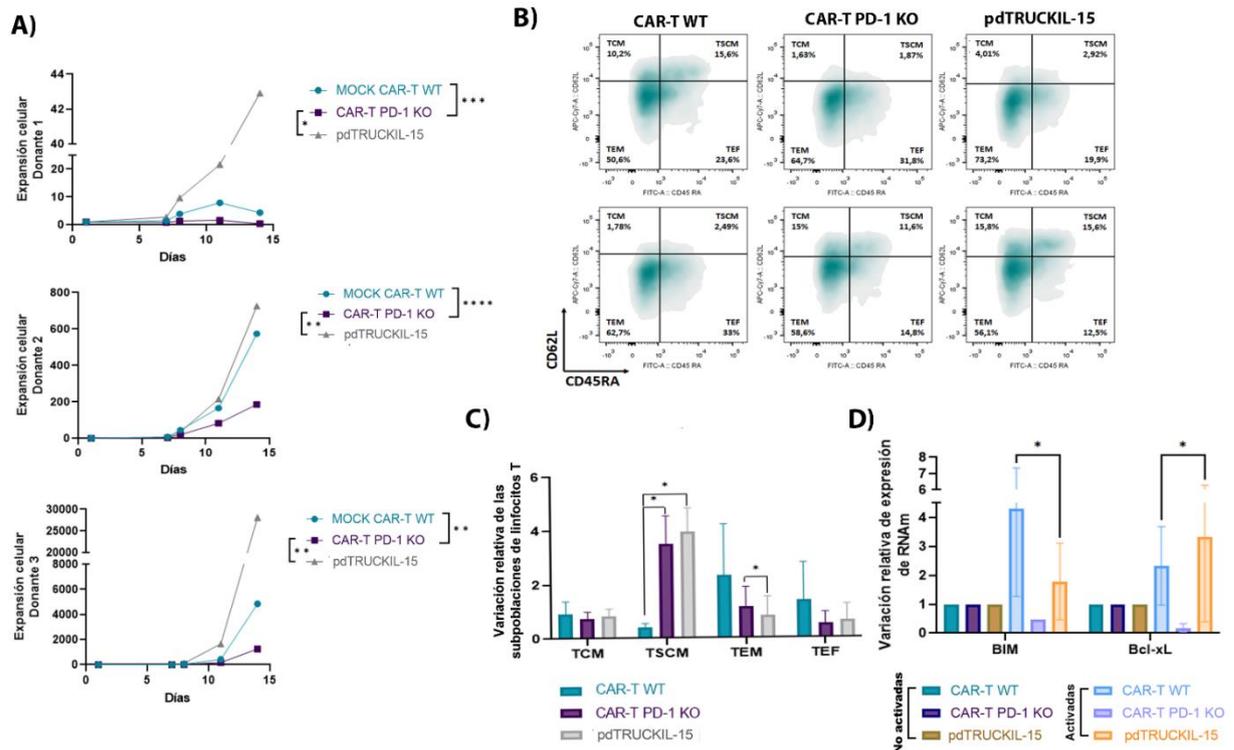
### 4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15

Una vez hemos comprobado que IL-15 se expresa en las células editadas bajo el promotor endógeno de PD-1, se procedió a la caracterización de las células pdTRUCKIL-15.

En primer lugar, estudiamos la capacidad proliferativa de productos pdTRUCKIL-15, CAR-T PD-1 KO y CAR-T WT generados con tres donantes diferentes. La **Figura 32A**, se muestra el patrón de expansión por separado de cada donante, debido a la variabilidad entre ellos. Tal y como se demostró anteriormente, la proliferación de las células CAR-T PD-1 KO (**Figura 32A**, líneas **moradas**) se ve reducida en relación a las células CAR-T WT (**Figura 32A**, líneas **azules**). Interesantemente, y de acuerdo con nuestra hipótesis, las células pdTRUCKIL-15 recuperan la capacidad proliferativa, llegando incluso a ser mayor que la de las células CAR-T no editadas (**Figura 3A**, líneas **grises**).

En segundo lugar, realizamos un estudio inmunofenotípico de las células CAR-T editadas basados en la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD62L para determinar el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células T. Tras tres días de activación celular, estos análisis mostraron que la distribución de las poblaciones memoria no se ve significativamente afectada por la expresión de IL-15 (**Figura 32B y 32C**) respecto de las células CAR-T PD-1 KO, con la salvedad de una pequeña reducción en la población T<sub>EM</sub>. Comparadas con las células CAR-T WT, la expresión de IL-15 incrementa de manera significativa la variación relativa de la población T<sub>SCM</sub>.

Para terminar, estudiamos la expresión de BIM (gen pro-apoptótico) y Bcl-xL (gen anti-apoptótico) relacionados con los efectos de IL-15 [88] [97] con la finalidad de poder explicar el incremento en la capacidad proliferativa de las células pdTRUCKIL-15. Los datos mostraron que la expresión de BIM disminuía desde 4.3 en las células CAR-T WT hasta 1.8 en células pdTRUCKIL-15. En la misma dirección, la expresión de Bcl-xL, incrementa desde una media de 2.3 en células CAR-T WT hasta un 3.33 en células pdTRUCKIL-15 (**Figura 32D**). Curiosamente, en las células CAR-T PD-1 KO se observa una severa reducción de Bcl-xL tras la activación (**Figura 32D**). Estos datos sugieren que Bcl-xL podría estar involucrado en las diferencias en proliferación entre las células CAR-T PD-1 KO y las células pdTRUCKIL-15.



### 4.3.2. ESTUDIO METABÓLICO DE CÉLULAS pdTRUCKIL-15

Es importante caracterizar a nivel metabólico este producto pdTRUCKIL-15. Previamente, los datos han mostrado cómo las células CAR-T PD-1 KO muestran una tendencia hacia un fenotipo más memoria, posibilitando de esta manera una terapia más duradera. Sin embargo, también muestran una disminución significativa del SRC, siendo un dato importante y necesario de abordar. Ahora, debido a la expresión de IL-15, esperamos que el metabolismo de las células

pdTRUCKIL-15 se vea mejorado al menos en términos de capacidad respiratoria disponible para este producto CAR [81].

Como se muestra en la **Figura 33A**, y siguiendo los análisis anteriores, la tasa de acidificación extracelular (ECAR) es superior en las células pdTRUCKIL-15 (34.42) respecto las células CAR-T PD-1 KO (18.88), aunque no llegue a conseguir los mismos niveles glucolíticos que las células CAR-T WT (51.05). Seguido de la actividad glucolítica, estudiamos la fuga de protones derivada de la actividad mitocondrial en la cadena de transporte de electrones (OXPHOS) donde la **Figura 33B izquierda** muestra un incremento significativo de la OXPHOS (14.5%) en las células pdTRUCKIL-15 en comparación con las células CAR-T PD-1 KO (5.54%) pero no respecto a las CAR-T WT (16.58%). Lo mismo ocurre al analizar la tasa de consumo de oxígeno (OCR), (**Figura 33B centro**), donde los datos mostraron un incremento de la tasa en las células expresoras de IL-15 en comparación con las células CAR-T PD-1 KO.

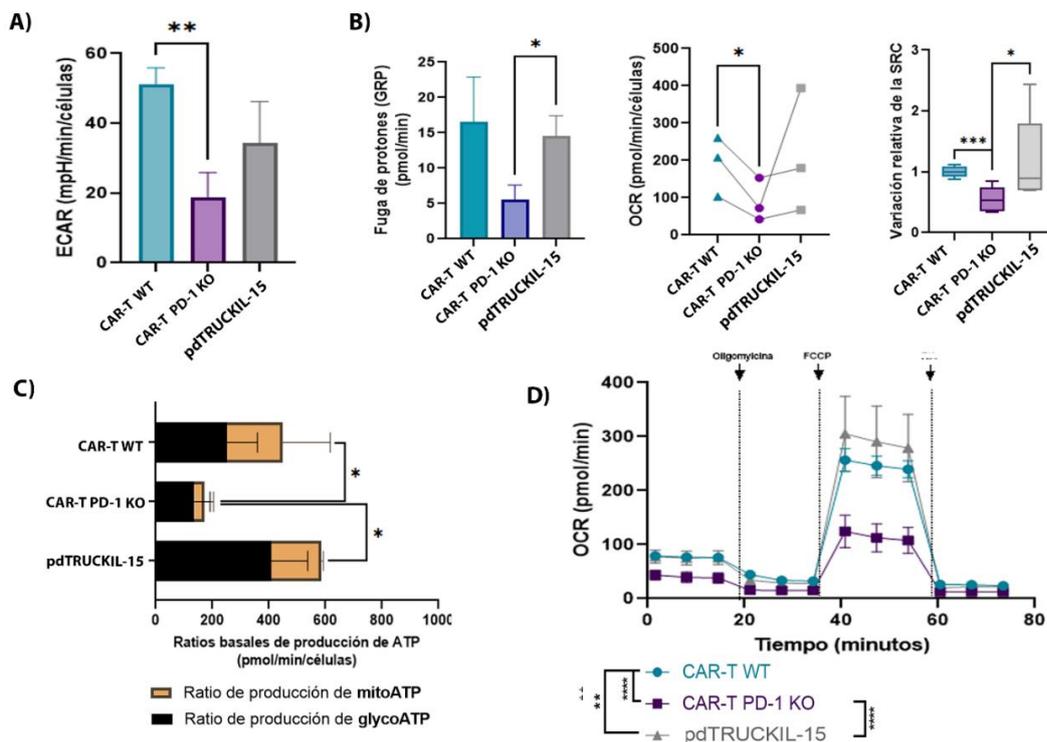
En este caso vemos una relación entre la OXPHOS y la respiración mitocondrial, pudiendo deberse a que IL-15 favorece la FAO (ruta vinculada a las células memoria) [30]. Además, la FAO es una vía importante para la supervivencia en células sometidas a estrés metabólico, incrementando los niveles de la OXPHOS por otra vía complementaria a la mitocondrial y la glicolítica [30]. Esta información, junto con los datos previos, se traduce en un incremento en la capacidad respiratoria disponible (SRC) de las células pdTRUCKIL-15 respecto de las células CAR-T PD-1 KO, revirtiendo por completo esta característica metabólica mitocondrial en las células editadas (**Figura A 33B derecha**).

Finalmente, estudiamos la capacidad energética de estas células (**Figura 33C**) tanto a nivel glucolítico (glycoATP, negro) como mitocondrial (mitoATP, naranja). Las células pdTRUCKIL-15 presentan un incremento significativo en su capacidad de generar energía en comparación con las células CAR-T PD-1 KO, casi dos veces (1.8) más a nivel glucolítico y hasta 5.8 veces a nivel mitocondrial, certificando de esta manera las propiedades bioenergéticas mejoradas tras la expresión de IL-15.

Mediante el estudio de los parámetros de respiración críticos para la demanda de sustratos, es posible estudiar de manera más detallada la SRC, una medida validada y confiable de la función mitocondrial que está bien establecida como un indicador sólido sobre la subpoblación fenotípica y la aptitud de las células del SI en términos efectores. La **Figura 33D** muestra cómo las células pdTRUCKIL-15 son preferencialmente, poblaciones memoria además de tener una

mayor capacidad antitumoral (**línea gris**) que las células CAR-T WT (**línea azul**) y CAR-T PD-1 KO (**línea morada**).

Una vez vistos estos resultados cabría esperar que, debido a esta mejora general en el *fitness* celular gracias a la expresión de IL-15 (recuperando la capacidad energética total, incluso superando a las células CAR-T WT en valores de ATP totales), la lisis antigénica se verá favorecida ya que estas células presentan un potencial incremento en sus poblaciones memoria junto con características efectoras y metabólicas en función de los datos observados con las células CAR-T PD-1 KO.



**Figura 33. Las células pdTRUCKIL-15 muestran características metabólicas memoria junto con una mejor capacidad respiratoria disponible que las células CAR-T PD1 KO tras tres días de activación celular con nanomatrix  $\alpha$ CD3- $\alpha$ CD28.**

**A)** Evaluación de la glucólisis mediante la medición de la tasa de acidificación extracelular (ECAR). Los datos revelan una disminución significativa de ECAR en las células CAR-T PD-1 KO en comparación con las células CAR-T WT (n=4. p valor = 0,0098). En las células pdTRUCKIL-15, esta disminución de ECAR con respecto a las células CAR-T WT no es significativa (n=4. P valor = 0,1311, ns).

**B)** Análisis de la Respiración mitocondrial estudiando la fuga de protones, tasa de consumo de oxígeno (OCR) y capacidad respiratoria disponible (SRC). Con un n=3, las células pdTRUCKIL-15 presentan un incremento significativo de la tasa de fuga de protones (**izquierda**) respecto de las células CAR-T PD-1 KO (p valor = 0.0336) pero no de las CAR-T WT (p valor = 0.3784), una mayor tasa de consumo de oxígeno (**centro**) que las células CAR-T WT (p valor = 0,0042) y las células PD-1 KO (p valor = <0,0001) y un incremento significativo de la SRC (**derecha**) respecto de las células CAR-T PD-1 KO (p valor = 0.0252) pero no respecto a las CAR-T WT (p valor = 0.2449).

**C)** Medición de la tasa de producción de ATP, tanto mitocondrial (**mitoATP, naranja**) como glicolítica (**glycoATP, negro**). La tasa de producción de glycoATP en las células pdTRUCKIL-15 incrementó en comparación con las tasas de las células CAR-T PD-1 KO (n=3. p valor = 0,1654), pero no lo hizo en comparación con las células CAR-T WT (n=3. p valor = 0,0586). Por otro lado, la tasa de producción de mitoATP en las células pdTRUCKIL-15 incrementan de manera significativa en comparación con las células CAR-T PD-1 KO (n=3. p valor = 0,0456) pero no varían respecto a las células CAR-T WT.

**D)** Perfil del Ensayo de Estrés de Oxidación de Sustratos Agilent Seahorse XF, que muestra los parámetros de respiración críticos para la demanda de sustratos, mostrando por tanto la SRC. Las células pdTRUCKIL-15 presentan un incremento significativo respecto de las células CAR-T WT (p valor = 0.0042) y CAR-T PD-1 KO (p valor = <0.0001).

#### 4.4. ESTUDIO DE ESTRATEGIA KI CON ADNcs MÉTODO VIRAL VS NO VIRAL

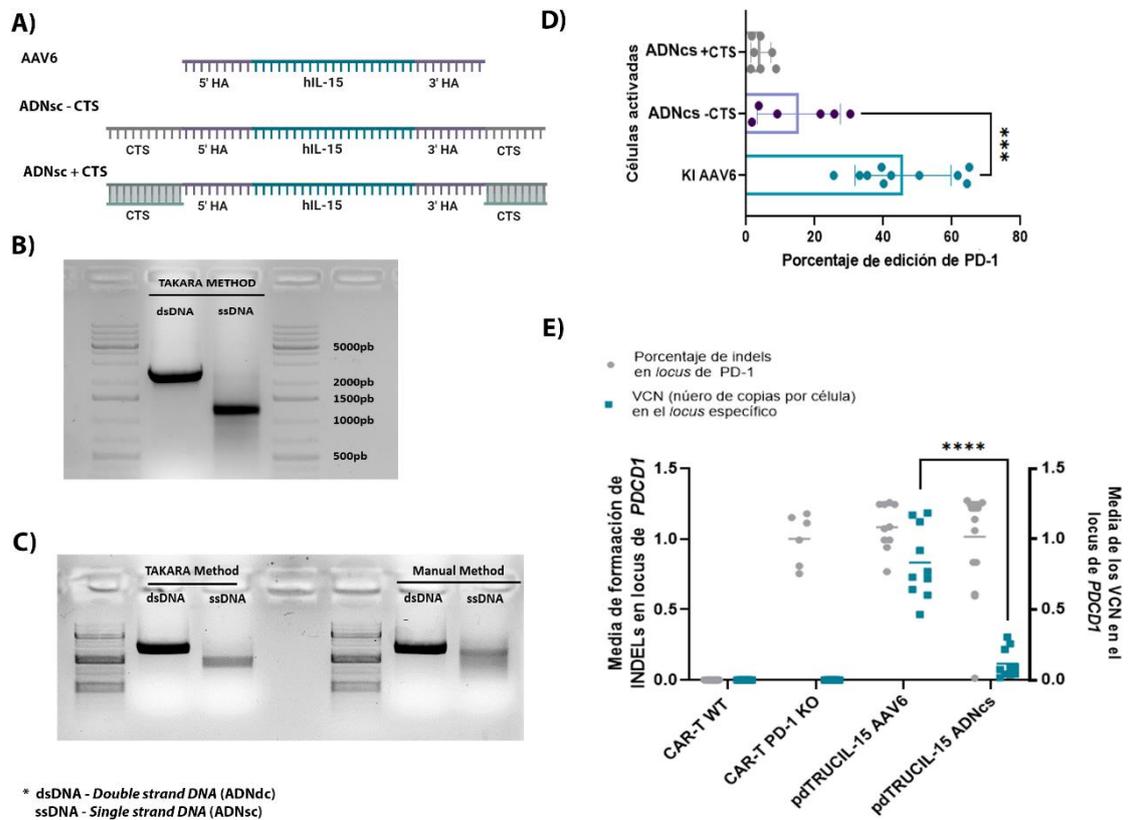
Hasta el momento y en base a las primeras optimizaciones realizadas en las primeras fases de la Tesis, todos los experimentos de KI se han realizado con vectores AAV6 para entregar el ADN donador. Nuevos trabajos han comenzado a utilizar ADN de cadena simple (ADNcs) para realizar estrategias de KI evitando los efectos negativos del uso de vectores virales. Éste es el motivo de mi estancia predoctoral en la Universidad de Aarhus, Dinamarca. Realizamos una colaboración con el laboratorio del Dr. Rasmus O. Bak para generar pdTRUCKIL-15 con esta nueva tecnología. Realizamos comparaciones entre AAV6 y dos tipos de secuencia de ADNcs: (1) sin CTS (*Cas9 target sequences*) y (2) con CTS. Los CTS son unas secuencias específicas que permiten que se unan a las regiones del guía de las RNPs por homología, facilitando así la entrega del transgén a las zonas con DSB. La literatura dice que esta secuencia CTS es efectiva cuando es un ADNdc. Por tanto, diseñamos dos cebadores diferentes para hibridarlos con esta secuencia ADNcs CTS llamados cebadores oligocomplementarios (**Figura 34A**) [208].

Una vez tuvimos las construcciones hechas, decidimos poner a punto el protocolo de generación de ADNcs mediante un Kit comercial (**Figura 34B**). Por otro lado, se puso a punto una técnica diferente de generar ADNcs, de manera manual, mediante el uso de exonucleasas. Esta técnica permitía abaratar costes, pero no fue tan efectiva para generar los ADNcs como el Kit (**Figura 34C**). El procedimiento de estos protocolos se describe en la sección de M&M

Cuando realizamos las comparativas de los productos pdTRUKIL-15 generados mediante vectores virales y no virales, vimos cómo el método con AAV6 era significativamente más eficaz como vector donador, presentando un porcentaje de edición del 45.8%. Incluso vimos que la técnica sin CTS (15.36% de edición) era más efectiva que la técnica con CTS (4.28% de edición) (**Figura 34D**). Esto quizás puede verse debido al método de hibridación de los CTS con sus primers para generar esta pequeña secuencia ADNdc en los extremos, puesto que el ADNcs es muy inestable y las altas temperaturas requeridas podrían estar desnaturalizándolo.

Las diferencias tan grandes entre AAV6 y ADNcs para generar pdTRUCKIL-15 podrían ser debidas a interferencias entre las RNP y las secuencias de ADNcs, ya que son entregadas de manera simultánea y podría estar interfiriendo en la creación de DSB. Por tanto, se analizó la generación de INDELS en cada una de las muestras, incluyendo como control a las células CAR-T PD-1 KO. De igual manera, se estudió la media de integración de IL-15 en el locus de *PDCD1*. Como se observa en la **Figura 34E**, la generación de INDELS en el locus *PDCD1* no se ve afectada por la entrega

conjunta de RNP y las secuencias de ADNcs, pero la media de número de copias por célula (VCN), en relación a la conseguida con los AAV6, disminuye notablemente.



**Figura 34. La técnica de KI para pdTRUCKIL-15 con ADNcs como donador del transgén no consigue la misma eficiencia de edición genómica que con AAV6.**

**A)** Esquema representativo de los distintos donadores de ADN utilizados en el estudio comparativo entre diferentes donadores para la estrategia de KI en el locus de *PDCD1* (AAV6, ADNs -CTS, ADNs +CTS).

**B)** Obtención del producto ADNcs donador para los experimentos de *Knock-in* en células T.

**C)** Comparativa de la calidad del producto de ADNcs obtenido mediante dos protocolos distintos.

**D)** Porcentaje de edición de IL-15 en el locus de *PDCD1* utilizando los distintos donadores del estudio. El uso de ADNcs reduce significativamente la eficiencia de edición de KI de IL-15 (p valor = <0.0001).

**E)** Correlación entre la eficiencia de generación de INDELS e integración de IL-15 en el locus *PDCD1* a través de cada técnica de edición génica utilizada. No se aprecian diferencias entre la generación de INDELS entre ninguna de las técnicas de KO ni KI (mediante uso de AAV6 o ADNcs) pero sí se muestra una disminución en la eficiencia de integración comparando ADNcs frente a AAV6 como método de entrega del transgén (p valor = <0.0001).

Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se basa en un T-test no pareado de una cola.

## 5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTILEUCÉMICA DE LAS CÉLULAS pdTRUCKIL-15 FRENTE A LAS CÉLULAS NAMALWA PD-L1+

Una vez optimizado el protocolo para generar las células pdTRUCKIL-15 y establecida su capacidad de secretar IL-15 tras ser activadas, procedimos a analizar su actividad antitumoral frente a células tumorales expresoras de PD-L1 desarrolladas anteriormente en el apartado 3.1 (ver esquema de la **Figura 35A**). Para ello, utilizamos las condiciones establecidas previamente con las células CAR-T PD-1 KO (ver apartado 3.3). Las células CAR-T WT, las CAR-T PD-1 KO y las células pdTRUCKIL-15 generadas a partir de tres donantes sanos fueron enfrentadas a cuatro encuentros con las células Namalwa PD-L1+ (el co-cultivo inicial, más tres reencuentros (R) para generar más estrés celular) (**Figura 35B**). La actividad lítica fue analizada cada 24 horas los dos primeros días y cada 48 a partir del día 2. Al final del experimento (día 8), se estudió el fenotipo y la persistencia de las diferentes células CAR-T utilizadas.

Tal y como habíamos descrito previamente, las células pdTRUCKIL-15 son capaces de mantener una mayor lisis frente a las células Namalwa PD-L1+ en comparación con las células CAR-T WT (**Figura 35B**, día 2). Como hipotetizábamos, las células pdTRUCKIL-15 son las más eficaces de las tres, lisando prácticamente todas las células diana tras cada reencuentro. La lisis mediada por las células pdTRUCKIL-15 es significativamente mayor que la mediada por las células CAR-T WT y mejor que la llevada a cabo por las CAR-T PD-1 KO.

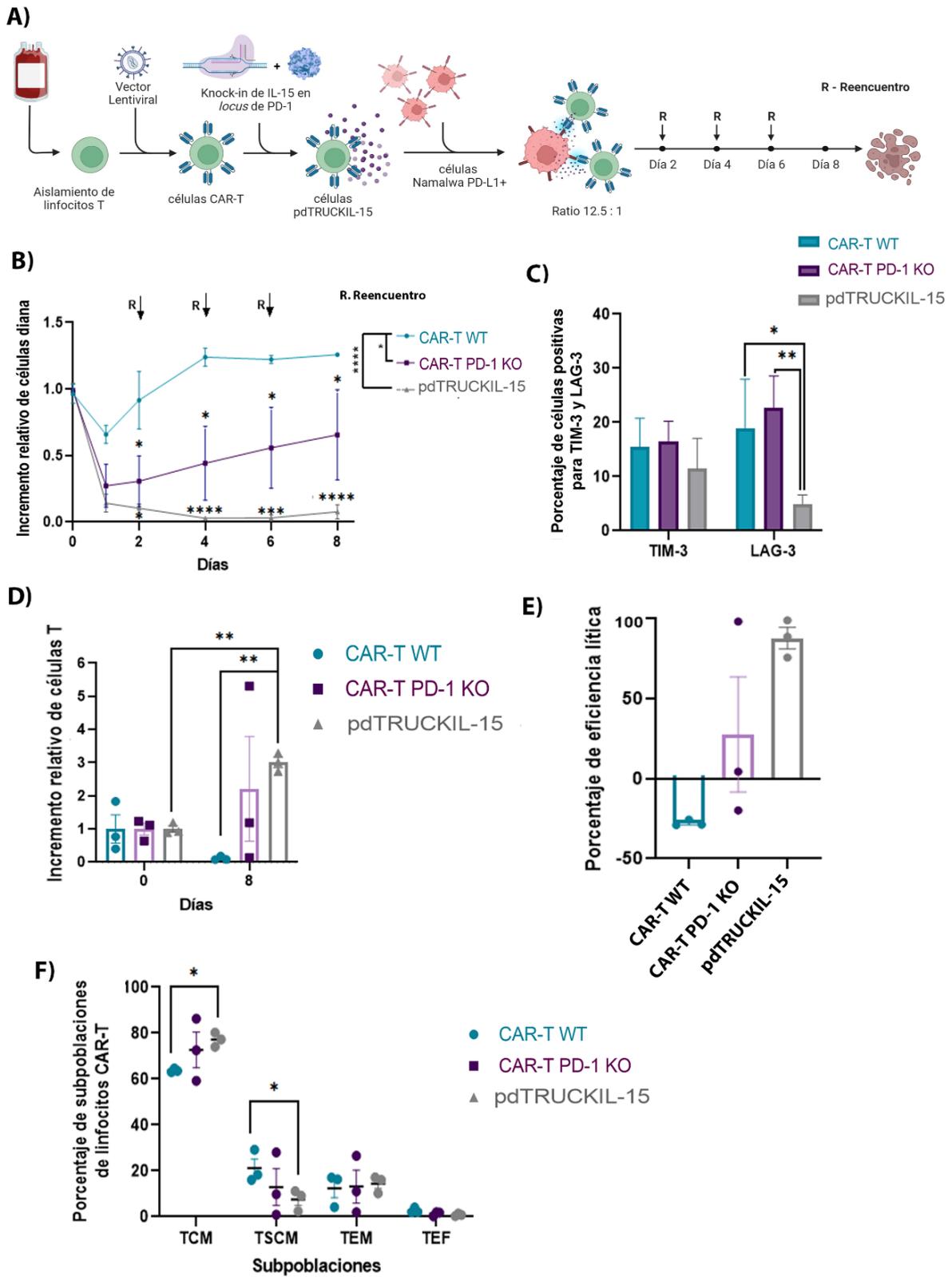
Los dos marcadores de agotamiento estudiados a punto final del experimento, TIM-3 y LAG-3, se expresan de forma similar tanto en las células CAR-T WT como en células CAR-T PD-1 KO. Sin embargo, ambos marcadores se reducen en las células pdTRUCKIL-15, de manera significativa para LAG-3 (**Figura 35C**).

A tiempo final del experimento, las células CAR-T PD-1 KO incrementaron hasta dos veces respecto a punto inicial mientras que las células pdTRUCKIL-15 presentaron un incremento de hasta tres veces (**Figura 35D**). Además, el número de células CAR-T WT se reduce unas 5 veces a tiempo final, sugiriendo una mejor capacidad de persistencia. Estos datos concuerdan con la mejora en la eficiencia de lisis de las células pdTRUCKIL-15 (**Figura 35E**), donde las células pdTRUCKIL-15 muestran un porcentaje de eficiencia lítica de un 90%, respecto al 30% obtenido con las células CAR-T PD-1 KO.

El análisis de las subpoblaciones mediante CF (medidas en base a la expresión de CD45RA y CD62L por tinción extracelular, en la **Figura 35F**) tras los diferentes encuentros con las células diana PD-L1+ señala que las células pdTRUCKIL-15 presentan un incremento significativo de la

población de células  $T_{CM}$  respecto de las células CAR-T WT (77.3% frente a un 64.6%) y una disminución también significativa de la población  $T_{SCM}$  frente a las células no editadas (9.16% frente a un 18.5%). Además, aunque no es significativa, las células pdTRUCKIL-15 presentan una tendencia a incrementar la subpoblación de células  $T_{EM}$  (16%) frente al 10% y 11% en células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO. Estas variaciones en las poblaciones memoria encajan con la capacidad lítica que hemos podido observar, puesto que las células  $T_{SCM}$  tienen una alta capacidad proliferativa pero no tienen capacidades efectoras, a diferencia de las  $T_{EM}$  y  $T_{CM}$ .

Como muestran todos los resultados, la expresión de IL-15 confiere un *fitness* mejorado tras la eliminación de PD-1 en términos de metabolismo, fenotipo, capacidad lítica y proliferativa de las células pdTRUCKIL-15 validando esta plataforma para su uso en nuevas estrategias CAR-T.



**Figura 35. Lisis y persistencia mejoradas en células T pdTRUCKIL-15 dirigidas a células PD-L1+.**

**A)** Flujo de trabajo del ensayo de lisis realizado. Se co-cultivaron 25000 células Namalwa PD-L1+ frente a 10000 células CAR-T, CAR-T PD-1 KO y pdTRUCKIL-15, expresando alrededor de un 20% de CAR. Por tanto, el ratio establecido en el co-cultivo (D:E\_CAR) es de 12.5:1, donde son enfrentadas 12.5 células Namalwa PD-L1+ (D) frente a una molécula CAR (E\_CAR).

**B)** Incremento relativo de células diana respecto al día inicial. Gráfico que muestra la lisis de células Namalwa PD-L1+ mediada por células CAR-T WT, PD-1 KO y pdTRUCKIL-15 en una ratio 12.5:1. Estudiando las diferencias del número de células diana en el cultivo en el punto final (día 8) tras cuatro encuentros con las células diana, se observa cómo las células Namalwa PD-L1+ son lisadas en el caso de las células CAR-T PD-1 KO y pdTRUCKIL-15 de manera significativa a tiempo final respecto a las células CAR-T WT (p valor= 0.0246 y <0.0001 respectivamente) con un n=4. Las células pdTRUCKIL-15 presentan una tendencia a mejorar la capacidad de lisis de las células CAR-T PD-1 KO, pero no llega a ser significativa debido a la variabilidad de los donantes utilizados (ns, p valor = 0,0838).

**C)** Porcentaje de expresión de los marcadores de agotamiento TIM-3 y LAG-3 a tiempo final del experimento mediante CF. El gráfico muestra cómo las células pdTRUCKIL-15 tienden a expresar un porcentaje menor de TIM-3 en comparación con las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO. Por otro lado, LAG-3 muestra una disminución significativa en las células pdTRUCKIL-15 en comparación con las células CAR-T PD-1 KO (n=4, p valor = 0,0037) y con las células CAR-T WT (n=4, p valor= 0,0285).

**D)** Gráfica mostrando el incremento de la persistencia de las células CAR-T WT, CAR-T PD-1 KO y pdTRUCKIL-15 a punto final del experimento de lisis medido respecto al porcentaje celular a tiempo inicial en el cultivo. Las células pdTRUCKIL-15 muestran un aumento significativo de la capacidad de persistir en el cultivo respecto de las células CAR-T WT (p valor = 0.0011) y de las células sin activar (p valor = 0.0073) pero no con las células CAR-T PD-1 KO debido a la variabilidad entre los donantes utilizados en el estudio (ns, p valor = 0.3294).

**E)** Gráfica mostrando el porcentaje de lisis en las células de estudio. Las células pdTRUCKIL-15 muestran un incremento significativo en su capacidad lítica frente a las células CAR-T WT (n=3 p valor = 0,0013) pero, aunque muestra una tendencia a mejorar respecto a las células CAR-T PD-1 KO, no es significativa (ns, p valor = 0.1132). El porcentaje de lisis se calcula como se describe en M&M.

**F)** Gráfico que muestra la distribución de las subpoblaciones fenotípicas de células T distribuidas en función del porcentaje de expresión de los marcadores CD62L y CD45RA medido por citoetría. Las células pdTRUCKIL-15 a tiempo final muestran un incremento de la población  $T_{CM}$  (n=4, p valor = 0.0135) y una disminución de la subpoblación  $T_{SCM}$  en comparación con las células CAR-T WT (n=4, p valor= 0,0334). En cuanto a las subpoblaciones  $T_{EM}$ , las células pdTRUCKIL-15 muestran una tendencia a incrementarlas, pero no es significativa, con un p valor de 0.3736 respecto de las células CAR-T WT. No se aprecian diferencias significativas entre las poblaciones efectoras.

Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de una cola.



## DISCUSIÓN

---

La terapia **CAR-T** combina la **terapia celular adoptiva, la inmunoterapia y la terapia génica**. Los mayores éxitos han venido de la mano de las neoplasias hematológicas, donde se han aprobado varios medicamentos CAR-T para el tratamiento de diferentes formas de leucemias y linfomas tipo B, así como contra el mieloma múltiple. Desafortunadamente, a pesar de su eficacia, entre un 50-70% [227] de los pacientes tratados con estos productos CAR-T sufren recaídas, siendo estos datos incluso peores para algunos tipos de linfomas y mielomas [117]. Entre los factores involucrados se ha destacado la falta de la persistencia celular y un fenotipo diferenciado por parte de los productos infundidos en el paciente, así como la evasión antigénica y/o la expresión de moléculas inhibitorias por parte de las células tumorales. Por otra parte, las terapias CAR-T han logrado muy pocos éxitos terapéuticos frente a tumores sólidos, donde, además de los problemas mencionados anteriormente, las células CAR-T se enfrentan a barreras físicas y a un TME mucho más inmunosupresor [158].

Para tratar de solventar estos problemas, esta tesis se ha centrado en el eje **PD-1 / PD-L1**, que confiere a las células tumorales **capacidades extraordinarias de escape tumoral**, tanto de forma directa [309][310] como indirecta, actuando sobre las células T [298][302]. La señalización de este único eje tiene efectos sobre una gran variedad de puntos inmunológicos, resultando negativo para el paciente tratado. Entre estos efectos, la inducción de linfocitos Treg y de agotamiento, anergia y apoptosis celular, inhibición de la función lítica y de la señalización a través del TCR de las células T además de la inhibición de la presentación de los antígenos por parte de las células APC (**Figura 8**) [76]. Para conseguir evitar el efecto del eje PD-1/PD-L1 sobre la actividad antitumoral de las células CAR-T, decidimos eliminar la expresión de PD-1 mediante EG. Este enfoque fue diseñado con el objetivo de evitar tanto la señalización intracelular de PD-1 en las células CAR-T, como la desencadenada en las células cancerígenas que expresan PD-L1, debido al efecto beneficioso que esta última ejerce en la progresión tumoral [74]. El éxito de la terapia basada en el eje PD-1/PD-L1 puede verse reflejado en la cuantía de ensayos clínicos y productos aprobados por la FDA y la EMA para bloquear el mismo, ya sea mediante anticuerpos monoclonales frente a PD-1 [131] o PD-L1 [130] o bien, mediante EG de PD-1 [297] [298] o PD-L1 [306].

Por otro lado, cabe destacar que estas terapias **no son exitosas al 100%** [132][134][135], creando la necesidad de utilizar estrategias más avanzadas o combinadas.

## LAS CÉLULAS CAR-T PD-1 KO EXHIBEN UN MAYOR FENOTIPO MEMORIA Y UNA MEJOR ACTIVIDAD LÍTICA FRENTE A CÉLULAS TUMORALES PD-L1+, PERO CON UNA PEOR CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y METABOLISMO

Dado que el objetivo de la tesis es el desarrollo de una estrategia de EG que permita generar células CAR-T capaces de superar los frenos que conlleva la expresión de PD-L1 en las células tumorales [76], el primer objetivo fue encontrar las mejores condiciones para eliminar la expresión de PD-1 en las células T primarias. Para generar la EG de PD-1, se usó como método de entrega la electroporación de complejos RNPs formados por el complejo Cas9/ARNg, evaluando dos guías diferentes (ARNg1 y ARNg3) para la edición del locus *PDCD1* con el objetivo final de generar células CAR-T PD-1 KO. La determinación de la eficiencia de la edición genómica se basó en análisis por ICE, considerando el porcentaje de INDELS y el porcentaje de *knock-out* (*KO Score*) además de por citometría de flujo (mediante tinción extracelular de la proteína PD-1). Nuestros datos mostraron que el ARNg3 ofrecía la mayor eficacia para la generación de mutaciones que conducen a la eliminación funcional de PD-1 en las células T.

Nuestros resultados de eficacia y seguridad de edición de PD-1 van de la mano de los obtenidos en otros grupos [302][306][311], llegando a eficacias de alrededor del 70%. Tras la edición, procedimos a analizar el producto generado: las células CAR-T PD-1 KO.

Tal y se hipotetizó al inicio de este trabajo, la edición de PD-1 tuvo **efectos negativos en la expansión celular tras activación celular con una nanomatriz  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 durante tres días**. Estos resultados contradicen lo publicado en trabajos previos, donde esta misma modificación ha sido probada como un estímulo inductor en la capacidad de expansión de estas células editadas[299][307][308][309]. Sin embargo, en la mayor parte de dichos estudios, la actividad proliferativa de las células CAR-T PD-1 KO y CAR-T WT se determinaba al enfrentarlas a células PD-L1+, donde el efecto predominante de la señalización viene determinado por el eje PD-1/PD-L1. Por tanto, en este caso, los datos observados tras activación mediante  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 muestran que, en ausencia de señalización de este eje, las células CAR-T WT tienen un mayor potencial proliferativo que las células CAR-T editadas para PD-1. Por otro lado, aunque cabría esperar un fenotipo menos agotado derivado de la eliminación de PD-1, vimos que **las células CAR-T PD-1 KO mantienen el mismo perfil de expresión de los marcadores TIM-3 y LAG-3** en comparación con las células CAR-T no editadas, tras un protocolo de activación celular. Estos resultados confirman los trabajos de Wang y cols. [310] y de Odorizzi y cols. [311], donde la capacidad proliferativa se ve impedida y los marcadores de agotamiento incrementan en las células editadas para PD-1. Conjuntamente, los resultados obtenidos parecen indicar que la EG de PD-1 se traduce en una capacidad de supervivencia reducida, con una diferenciación terminal hacia

$T_{EX}$  y  $T_{PEX}$ . Esto podría deberse a que la señalización de la activación de las células T no es capaz de ser frenada debido al bloqueo de PD-1, favoreciendo así una sobre activación celular.

Para intentar entender en profundidad el efecto de la eliminación de PD-1 en las células T, decidimos analizar las características metabólicas de las células CAR-T tras la edición genómica y activación celular. Observamos que esta eliminación induce una **reducción de la glucólisis**, parámetro que está relacionado con una mayor población de células T memoria, lo cual se reflejó también en nuestros estudios de fenotipo por citometría. Estos resultados concuerdan con hallazgos presentados en otros trabajos, donde se destaca el papel crítico de una actividad glucolítica elevada en las células CD8+ y su influencia negativa en la formación de células memoria a largo plazo [312]. En cambio, la capacidad para generar energía en forma de ATP de las células CAR-T PD-1 KO disminuyó significativamente comparado con los datos obtenidos de células CAR-T WT, sugiriendo que las células editadas presentan un fenotipo efector, debido a la baja ganancia de ATP [28] por ausencia de glucólisis y el aumento de la captación de lactato. Estrechamente relacionado con estos resultados, se observó también que la **eliminación de PD-1 redujo la capacidad respiratoria disponible (SRC)** de las células. La SRC es una tasa que mide la capacidad de producir energía adicional almacenada en las mitocondrias, más allá de su estado basal, resultando crucial para la longevidad, la supervivencia a largo plazo y el funcionamiento óptimo de las células T.

Una vez caracterizados en detalle el fenotipo y la actividad metabólica de las células CAR-T PD-1 KO, se procedió a analizar el efecto sobre su actividad lítica. Para caracterizar la actividad antitumoral de las células CAR-T PD-1 KO, generamos células Namalwa (línea diana CD19+) que sobreexpresaran PD-L1. Es notorio destacar que, en este tipo celular, la sobreexpresión de PD-L1 no dio lugar a ningún incremento significativo en su capacidad proliferativa o tumorigénica en los modelos analizados.

Para realizar el estudio de lisis, se procedió al co-cultivo de células Namalwa PD-L1+ con células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO en un ratio 12.5:1 (diana:efectora CAR) donde se enfrentaron 12.5 células diana por cada receptor CAR. Pudimos demostrar que las células CAR-T PD-1 KO muestran una capacidad lítica significativamente mayor que las células CAR-T WT, como era de esperar según lo publicado por otros autores [306][311]. Estos resultados respaldan la idea de que la modulación de la vía PD-1 puede mejorar la eficacia y persistencia de las células CAR-T en un entorno PD-L1+, tal y como ya ha sido demostrado [298][315][316][317]. La mejora de la capacidad de persistir en el cultivo observada en las células CAR-T PD-1 KO en relación a las células CAR-T WT contribuye a destacar el papel crucial del eje PD-1/PD-L1 en la eliminación de

las células CAR-T WT, cuando se enfrentan a células PD-L1+, a pesar de presentar una peor capacidad mitocondrial.

Tras este enfrentamiento a células diana, la alta expresión de CD62L y CD45RA en las células CAR-T PD-1 KO sugiere la inducción de un fenotipo memoria en las mismas, aunque los resultados derivados del estudio de la capacidad metabólica indicaron que las células CAR-T PD-1 KO presentan una capacidad respiratoria y celular reducida.

La interpretación colectiva de los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo avala el papel dual de PD-1: por un lado, queda constancia del efecto negativo de su señalización sobre las células T ejerciendo un bloqueo; por otro lado, se refleja que la expresión de PD-1 también regula la persistencia de los linfocitos T<sub>EX</sub> frente a una excesiva estimulación [67], evitando la inducción de T<sub>PEX</sub>, la sobreactivación celular y la anergia. Como posible explicación, la edición de PD-1 podría estar provocando que, las células activadas no puedan experimentar un freno sobre su señalización interna y sean por tanto incapaces de evitar su sobreactivación, virando hacia un fenotipo exhausto de manera prematura. Por tanto, quedaría así explicada la baja capacidad de expansión junto con la expresión de los marcadores de agotamiento TIM-3 y LAG-3.

### CREACIÓN DE UNA PLATAFORMA PARA ELIMINAR PD-1 Y EXPRESAR DE MANERA CONTROLADA GENES QUE FAVOREZCAN LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS CAR-T EN EL ENTORNO INMUNOSUPRESOR DEL TUMOR

El desarrollo de la tesis nos ha llevado a proponer que **no es suficiente la eliminación de PD-1** en las células CAR-T para conseguir un avance enfocado en las terapias CAR actuales. Por lo tanto, diseñamos una estrategia basada en **HDR** para expresar un gen de interés en el locus *PDCD1*. Esto podría permitir no sólo eliminar PD-1, sino expresar genes bajo su promotor endógeno, regulable bajo activación celular [98][268], que potenciaran aún más la actividad de las células CAR-T y mejoraran su *fitness*. La **IL-15** fue nuestro candidato elegido debido a que es una citocina pleiotrópica, que **potencia las respuestas antitumorales** de las células T CD8+ y NK [94]. Se considera un **agente prometedor para la inmunoterapia del cáncer** [98][104][313], sobre todo debido a su efecto inductor hacia fenotipos memoria en los linfocitos T. Además, muchos estudios han demostrado que, si el material de partida (células T) no presenta un buen estado general, el tratamiento no será del todo efectivo [230]. Por ello, la consecución de nuestro objetivo de expresar IL-15 en estas células podría rescatarlas de este agotamiento prematuro.

Esta estrategia permite la sinergia entre la evasión de la inhibición de los linfocitos T inducida por el eje PD-1/PD-L1 junto con una mayor longevidad, un fenotipo memoria y una mayor

capacidad citotóxica de estas CAR-T debido a la expresión de IL-15 [268]. Para conseguir generar este producto pdTRUCKIL-15, se llevó a cabo la estrategia de KI para introducir el ADNc de IL-15, bajo el promotor endógeno del locus *PDCD1*. Con esta finalidad, se realizó en primer lugar una puesta a punto de la técnica de KI en células T humanas en un locus modelo (*TRAC*) para, a continuación, introducir la expresión de IL-15 en el locus *PDCD1*.

### **PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA *KNOCK-IN* EN CÉLULAS T PRIMARIAS**

La estrategia de KI involucra poner a punto los sistemas de entrega de los complejos RNP y del ADN donador de manera que sea lo más eficaz y menos deletérea posible para la fisiología de las células que se quieren manipular. En nuestro grupo de investigación ya abordamos previamente el impacto del método de entrega de la endonucleasa Cas9 en la eficiencia y especificidad de HDR en modelos celulares de K562. Para dicho proceso, se evaluaron tres métodos de entrega de CRISPR/Cas: electroporación de plásmido, electroporación de RNPs Cas9/ARNg y transducción con vectores lentivirales Cas9/ARNgs deficientes en integración (IDLVs). Las conclusiones de dicho trabajo reflejan que únicamente la nucleofección de RNPs presenta una leve mejora en la eficiencia de HDR. Cabe destacar que, en este modelo, más del 90% de todas las ediciones basadas en HDR son *on-targets* [318]. Estudios posteriores de nuestro grupo y otros equipos, demostraron que, en células T primarias, el sistema más eficaz para la entrega del sistema CRISPR (entre los IDLVs, plásmidos y RNPs) era la electroporación de RNP, que además ofrecía una menor probabilidad de generar *off-targets* [319].

Tal y como se mencionó en la introducción, la vía HDR es intrínsecamente ineficiente, especialmente para donadores de ADN de gran longitud. Durante el transcurso de esta tesis doctoral se han probado una amplia variedad de donadores tanto virales como no virales, para la inserción de grandes transgenes. Decidimos realizar un estudio comparativo entre dos vectores virales, IDLVs y AAV6, junto con un vector no viral; ADN de cadena simple (ADNsc), obtenido como producto de PCR para la estrategia KI de las células T primarias. Por lo tanto, una parte esencial de esta tesis se ha enfocado en la **optimización de la técnica de HDR** aplicada inicialmente al locus *TRAC* para, posteriormente, enfocarnos en el locus *PDCD1*.

Tras realizar la comparativa, nuestros resultados van en la misma dirección con los de otros grupos, donde muestran que los AAV6 son las herramientas más eficaces para conseguir integraciones de manera más eficiente en células T [197][208]. La entrega de los donadores en forma de ADN doble suele ser menos eficaz y más tóxica, mientras que los IDLVs, aunque menos tóxicos, han sido probados como más ineficaces en la mayor parte de los estudios.

A pesar de todo lo descrito, nuevos estudios apuntan a que la entrega de los sistemas de edición genómica con IDLVs podría ser ventajosa frente a otros sistemas de entrega como los AAVs. El laboratorio del Prof. Naldini publicó recientemente una comparativa entre ambos sistemas, con IDLV mejorados. Mediante la comparativa con la dosis máxima efectiva de cada vector, encontraron el mismo rango de eficiencia de edición y un perfil menos citotóxico con los IDLVs atribuido a una carga de ADN intracelular reducida en las células, y su posterior eliminación del genoma de manera más eficaz [175]. Por tanto, debido a que en nuestro laboratorio teníamos una gran experiencia en el uso de estos vectores lentivirales no integrativos, y sumado a que anteriormente conseguimos incrementar los niveles de expresión del transgén de estos IDLVs [305], decidimos utilizar estrategias similares para tratar de incrementar el título y la formación de partículas episomales en las células diana. De esta manera, conseguiríamos favorecer la entrega del transgén requerida para la HDR y obtener ratios de integración más altos que los obtenidos anteriormente, donde se realizaron los experimentos de KI con IDLVs diseñados sobre el esqueleto lentiviral básico (denominado SE).

Decidimos utilizar la secuencia quimérica IS2 desarrollada previamente en el laboratorio, junto con sus dos componentes, SAR2 y cHS4\_650, por separado. Los primeros estudios se realizaron en la línea celular HEK293T, donde vimos cómo el hecho de utilizar tanto secuencias largas (IS2, de alrededor de 1400pb) como el hecho de manipular el LTR, confería un menor número de formación de episomas virales en el núcleo de la célula diana, quizá debido a la interferencia con la transcripción reversa del virus. Para realizar los siguientes estudios en células T decidimos utilizar aquellas secuencias que conferían mejores resultados en términos de expresión del transgén (SAR2 e IS2) pero situados fuera del LTR. De nuevo, los datos en células T nos mostraron un incremento de la formación de partículas sólo en el caso de la construcción con el elemento SAR2, pero no confería ningún incremento en porcentaje ni en intensidad de fluorescencia del transgén respecto de los elementos virales control (SE).

Finalmente, debido a que no conseguimos ninguna eficacia de integración con los IDLVs utilizados y a que tampoco conseguimos mejorar las propiedades virales de los mismos para utilizarlos como herramienta de entrega genética para HDR en células T, **seleccionamos los vectores virales AAV6 como herramienta**, los cuales sí tienen demostrada una alta eficiencia de edición en células T.

**GENERACIÓN DE CÉLULAS pdTRUCKIL-15: CÉLULAS CAR-T PD-1 KO EXPRESANDO IL-15 A TRAVÉS DEL PROMOTOR ENDÓGENO DEL LOCUS *PDCD1*.**

Una vez seleccionados los métodos de entrega de la RNP y del ADN donador, procedimos a generar las **células CAR-T de 4ª generación (pdTRUCKIL-15)** donde, además de **eliminar PD-1**, se indujo la expresión de **IL-15** bajo el control del promotor endógeno de este locus. Seguidamente, se realizó un posterior análisis en profundidad de los efectos positivos y negativos derivados de la eliminación de PD-1 junto con la expresión de IL-15 en las células CAR-T. Con dichos experimentos se pretendía ver una sinergia entre la disrupción de este receptor inhibidor junto con la expresión de esta citocina proinflamatoria, la cual debería inducir un fenotipo memoria y una mayor supervivencia y persistencia de las células CAR-T infundidas en el paciente.

Esta estrategia de inserción de un gen de interés en el locus *PDCD1* ya ha sido utilizada con anterioridad en un ensayo clínico ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) as #NCT04213469.), aunque insertando un CAR  $\alpha$ CD19 en el locus *PDCD1* [207][314].

La IL-15 es una citocina pleiotrópica con diversas funciones biológicas, entre las que destacan una proliferación y supervivencia mejorada de las células T y NK además de favorecer su actividad citotóxica y metabolismo [315]. Debido a estas propiedades, esta citocina ha sido ampliamente estudiada como un potente agente inmunoterapéutico frente a diferentes tipos de tumores, incluyendo el desarrollo de células TRUCK [95][97][98][268][313]. Sin embargo, existen varios efectos no deseados tras una exposición continuada de IL-15, que pueden llegar a generar enfermedades autoinmunes o incluso inducir progresión tumoral modulando el TME [91][89]. Estos datos indican que IL-15 ha de expresarse de forma controlada, y por ello, nuestra apuesta hipotetizaba que IL-15 se expresaría en las células CAR-T editadas siguiendo el patrón de expresión de PD-1, consiguiendo que IL-15 únicamente se exprese brevemente tras la activación celular o cuando las células comenzaran a presentar signos de agotamiento.

### **LA EXPRESIÓN DE IL-15 DE MANERA CONTROLADA MEJORA LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN, EL METABÓLICO Y LA ACTIVIDAD LÍTICA DE LAS CÉLULAS CAR-T.**

Tras la optimización de la estrategia de la técnica de KI con AAV6 como vector de entrega de ADN a las células diana decidimos evaluar, en primer lugar, la eficiencia de edición de las células pdTRUCKIL-15. Este nuevo producto presentaba una eficiencia de edición de más del 50% utilizando  $5 \times 10^4$  GC/mL del vector viral v6\_IL-15PDCD1 tras la electroporación con la RNP dirigida frente al exón 1 de *PDCD1*. A continuación, estudiamos si la expresión de IL-15 estaba determinada realmente por el promotor endógeno de PD-1, para lo que mantuvimos bajo **activación continua  $\alpha$ -CD3 /  $\alpha$ -CD28** a las células de estudio durante tres días y observamos cómo se **incrementaba la expresión de IL-15** hasta tres veces más en comparación con las células no activadas o en estado basal. Además de expresarse a nivel de **proteína**, corroboramos que IL-

15 también se expresa a nivel de **mensajero** tras la activación celular. Comprobamos también que las células pdTRUCKIL-15 son capaces de **secretar** la citocina al medio, casi 10 ng por mL más tras activación celular.

A continuación, estudiamos la cinética de expresión de IL-15 y PD-1 en las células pdTRUCKIL-15 tras activación celular. Realizamos el seguimiento de los patrones de expresión de ambos genes por citometría de flujo, mediante tinción intra y extracelular. Fuimos capaces de demostrar cómo las células WT no expresaban IL-15 además de mostrar que la expresión de PD-1 alcanza su máximo valor tres días tras la activación continuada, siguiendo el patrón esperado en las células CAR-T WT. Al contrario, las células pdTRUCKIL-15 mostraron un patrón de expresión de PD-1 distinto al de las células CAR-T WT, pero prácticamente reproducía el mismo que el observado para IL-15. Estos datos nos sugieren que el patrón de expresión de PD-1 está pudiendo ser modificado tras su edición, ya que el ARNg3 se dirige al exón 1, donde hay muchas regiones de control transcripcional del propio gen. Aun así, la expresión remanente de **PD-1** de aquellas células que no han sido editadas **concuera con el patrón de expresión de la citocina IL-15**. Destacamos que para la obtención de datos más robustos sobre estos patrones de expresión es necesaria la realización de múltiples estudios adicionales, incluyendo la comparación de los ARNm o la realización de estudio transcriptómico.

Tras corroborar la capacidad de integración de IL-15 en un locus específico del genoma y determinar que se expresaba y se secretaba de manera correcta, decidimos realizar la misma caracterización celular que se llevó a cabo con las células CAR-T PD-1 KO. En primer lugar, observamos cómo **la expresión de IL-15** en las células pdTRUCKIL-15 confiere **capacidades proliferativas altamente significativas** tanto si las comparamos con las células CAR-T WT como, por supuesto, con las células CAR-T PD-1 KO en tres donantes independientes como habíamos hipotetizado. De esta manera, la expresión de IL-15 está revirtiendo los problemas proliferativos observados en las células CAR-T PD-1 KO. El mecanismo por el que IL-15 restaura la actividad proliferativa en las células editadas podría venir derivado de la inducción de factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y Bcl-xL [9][79]. Ciertamente, nuestros resultados revelaron que en las células pdTRUCKIL-15 activadas, la expresión del ARNm de Bcl-xL (**proteína anti-apoptótica**) se ve **umentada** de manera significativa en comparación con las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO activadas, quienes en este caso presentaron una disminución de esta. Además, ocurre lo contrario con la expresión de BIM (proteína **pro-apoptótica**) donde las células pdTRUCKIL-15 mostraron una **disminución** en la expresión de su ARNm tras ser activadas. Esta inducción sobre la expresión de las proteínas apoptóticas podría estar afectando de manera

directa o indirecta en el fenotipo y la expansión observados tras la activación celular en las células editadas para PD-1, ya que también se observa una disminución de la expresión del ARNm de Bcl-xL en células CAR-T PD-1 KO tras activación celular. En la misma dirección, diferentes trabajos señalan que la activación de la vía JAK/STAT a través de la señalización de IL-15 puede iniciar adicionalmente las vías PI3K/AKT/mTOR y Ras/Raf/MAPK, las cuales inducen conjuntamente la expresión y activación de c-myc, c-fos, c-jun, Bcl-2, Bcl-xL y NF- $\kappa$ B, y reducen la expresión de BIM, promoviendo en última instancia la supervivencia, proliferación y activación de las células T CD8+[97][316][317].

La expresión de IL-15 también debería suponer una mejora metabólica en las células T [96][315] y por lo tanto, también en las células CAR-T PD-1 KO. Esta hipótesis viene determinada por el trabajo de Flati y cols. en el que mostraron que algunos activadores metabólicos de AMPK, mTOR y PGC1- $\gamma$  (como IL-15) sincronizados con el bloqueo de PD-1, inducen biogénesis mitocondrial, promoviendo FAO y OXPHOS, aumentando Bcl-2 y generando células efectoras de memoria de larga duración, traducándose en una regresión tumoral [37]. Además, concuerda con el trabajo de Zhang y cols. donde sugieren combinar la estrategia del bloqueo de PD-1 junto con la expresión de compuestos concretos que activen ciertas vías metabólicas clave [318], como es IL-15.

De forma similar a lo ya descrito, nuestros estudios metabólicos mostraron que las células pdTRUCKIL-15 activadas experimentan un aumento en las tasas de glucólisis, de OXPHOS y SRC en relación con las células CAR-T PD-1 KO. Esto sugiere que la **IL-15 contribuye a la respiración mitocondrial** y que su expresión controlada **mejora el estado metabólico** de las células editadas para PD-1. El hecho de experimentar un incremento en la glucólisis podría sugerir que las células expresoras de IL-15 tienen una capacidad efectora mejorada. Adicionalmente, el aumento observado de la OXPHOS sugiere que estas células podrían estar utilizando también la FAO [47]. **Además, los estudios inmunofenotípicos** por citometría revelaron que **las células pdTRUCKIL-15 presentan un perfil más memoria**. Dichos datos se ven altamente reforzados por los resultados obtenidos al estudiar la capacidad energética de las células, que sugirieron que las pdTRUCKIL-15 tienen un fenotipo memoria predominante [28], ya que su capacidad energética global se ve revertida respecto a las células CAR-T PD-1 KO, donde la tasa de mitoATP incrementó 6 veces en comparación a las células CAR-T PD-1 KO.

Hasta aquí, hemos demostrado que la expresión de IL-15 confiere capacidades celulares óptimas para las células CAR-T PD-1 KO. Entre los mecanismos involucrados en estas mejoras, destacan: **1) incremento de genes anti-apoptóticos** como Bcl-xL y un **descenso de genes pro-apoptóticos**

como BIM, como era esperado [78]; 2) **expansión** de subpoblaciones de células T memoria, e inducción de la **biogénesis mitocondrial**, traducido en un **incremento de la SRC** y; 3) una **inducción de células T memoria**, debido a la inducción de la señalización de la vía JAK/STAT [319]. Todas estas características de mejora sugieren que la expresión controlada de IL-15 mediante la edición genómica en el locus *PDCD1* impacta de manera positiva en el metabolismo celular, promoviendo una mayor respiración mitocondrial, favoreciendo una expansión sostenida con un fenotipo más memoria de estas células CAR-T editadas.

### **EL USO DE ADNcs COMO VECTOR DE ENTREGA GENÉTICO DISMINUYE LA EFICIENCIA DE INTEGRACIÓN RESPECTO AL USO DE AAV6.**

Antes de estudiar la capacidad lítica de las células pdTRCKIL-15, quisimos realizar la misma estrategia de KI de IL-15 tratando de evitar el uso de vectores virales con la finalidad de reducir costes y ciertos efectos adversos colaterales. Con este objetivo se estableció una colaboración con el laboratorio del Dr. Rasmus O. Bak en Aarhus (Dinamarca) para realizar comparativas de eficiencia de KI usando vectores virales (AAV6) y no virales (electroporación de ADNcs). El uso de ADNcs ha surgido a lo largo de estos últimos años como alternativa a la entrega de ADN donador. Es cierto que ya existía su análogo, el uso de ADNdc como hemos podido comprobar en este trabajo, pero debido a la longitud del mismo y a su naturaleza, suele manifestarse este método de entrega como una estrategia bastante tóxica para las células al igual que suele ocurrir con el uso de plásmidos. La idea de utilizar **ADNcs** es bastante interesante, puesto que la cantidad de ADN entregada a la célula es menor, además de que se reducen los costes y tiempos de espera en comparación con el uso de vectores virales [208].

Una vez conseguimos poner a punto la obtención y purificación de ADNcs, las comparativas entre las tres condiciones (dos condiciones distintas de ADNcs frente a una de AAV6) mostraron que el uso de ADNcs disminuía más de dos veces el porcentaje de eficiencia de integración comparado con los AAV6. Debido a estos resultados decidimos estudiar la posibilidad de una competencia entre los ADNcs y las RNP electroporadas en la célula, lo cual estaría interfiriendo por tanto el proceso de generación de DSBs. Los datos mostraron que la edición de *PDCD1* era igual de eficiente en todos los casos, independientemente de la estrategia de entrega utilizada. Es posible que esta baja eficiencia se estuviera viendo condicionada por las concentraciones de vector de entrega utilizadas en ambos casos. Es difícil comparar ambas técnicas si no podemos utilizar la misma cantidad de ADN donador de partida y por ello intentamos cuantificar el ADN que estábamos entregando mediante la adición de  $5 \times 10^4$  GC/mL de AAV6, pero no pudimos cuantificarlo con exactitud, por lo que únicamente pudimos comparar las condiciones óptimas

utilizadas con los AAV6 como estaba establecido a lo largo de la tesis, junto con la mayor concentración obtenida en la purificación del ADNcs (6ug). Es posible que, si fuéramos capaces de purificar una mayor cantidad de ADNcs, pudiéramos conseguir eficiencias de edición más altas. Pero el punto hasta el que pudimos llegar nos sugirió de nuevo que los AAV6 seguían siendo la plataforma de elección para generar nuestros CAR-T de 4ª generación.

### LA EXPRESIÓN DE IL-15 DE MANERA CONTROLADA MEJORA LA ACTIVIDAD LÍTICA DE LAS CÉLULAS CAR-T.

Una vez comprobamos que la expresión de IL-15 confería capacidades celulares y metabólicas mejoradas respecto a las células CAR-T PD-1 KO, decidimos realizar los estudios de lisis. Esperábamos ver un incremento en la capacidad lítica de las células pdTRUCKIL-15 debido a la predominancia de poblaciones memoria, ya que las respuestas mediadas por las células memoria tras la primera exposición al antígeno (denominadas respuestas inmunitarias secundarias) suelen ser más rápidas, de mayor magnitud y más amplias que la primera respuesta, y a menudo son cualitativamente diferentes [3]. Los datos mostraron que efectivamente las células pdTRUCKIL-15, además de evadir los efectos negativos determinados por el eje PD-1 / PD-L1 gracias al KO de PD-1, exhibían una **mayor actividad antitumoral y persistencia** que las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO al ser co-cultivadas en un ratio 12.5:1 con las células diana Namalwa PD-L1+. Además, tal y como era esperable, se observó una tendencia a aumentar la subpoblación T<sub>EM</sub> y con la consecuente disminución de la subpoblación T<sub>EF</sub> en las células pdTRUCKIL-15 después de cuatro encuentros con las células tumorales Namalwa PD-L1+.

Observamos que los **marcadores de agotamiento** estudiados **disminuyen su expresión** en las células pdTRUCKIL-15 a tiempo final del experimento. TIM-3 muestra una tendencia a disminuir en comparación con las células CAR-T WT, mientras que en las células CAR-T PD-1 KO aumenta. Los efectos inmunosupresores de TIM-3 [320] podrían explicar la mejora en la capacidad lítica de las células pdTRUCKIL-15 frente a las otras dos condiciones CAR-T. De igual forma, la expresión de LAG-3 disminuyó de manera significativa en las células pdTRUCK-IL15 en comparación con las células CAR-T WT y CAR-T PD-1 KO. LAG-3 se encarga de modular la expansión y función de las células T [321], lo que podría explicar, en parte, la pobre expansión de las células CAR-T PD-1 KO y las mejoras observadas en las células pdTRUCK-IL15. Estos datos se ven reflejados en otros trabajos [322][323], donde las células CAR-T amplificadas *ex vivo* con IL-15 se caracterizan por una disminución en la expresión de moléculas de agotamiento. Este efecto de IL-15 sobre los receptores inhibidores estudiados es muy interesante ya que en el trabajo de Mollavelioglu y

cols. [54] se ha demostrado que la coexpresión de los receptores TIM-3 y LAG-3 se relaciona con una mala progresión del tratamiento.

Los resultados de estudios preclínicos y clínicos han llevado a la conclusión de **que IL-15 no es suficiente como agente único** y produce los mejores efectos cuando se combina con otros agentes, específicamente con inhibidores de puntos de control inmunológico y anticuerpos monoclonales [93][98][329]. Esto podría deberse a que IL-15 aumenta la expresión de los puntos de control inmunológicos TIGIT, TIM3, IL-10, así como la expresión de PD-1 [93], por lo que los datos observados en este trabajo en términos de expresión de PD-1 y TIM-3 son prometedores.

IL-15 ha demostrado actuar en sinergia con anticuerpos anti-PD-L1 y anti-CTLA-4, potenciando así un efecto antitumoral más fuerte [272]. Dicha combinación ha sido probada como capaz de inducir un aumento en la muerte tumoral mediada por CTL y la secreción de IFN- $\gamma$ , así como una disminución en la expresión superficial de PD-1 y una supervivencia prolongada en comparación con el tratamiento solo con IL-15 [89].

El hecho de obtener unos resultados tan prometedores con el uso de esta estrategia combinada es propio de una relación de simbiosis biológica entre la eliminación de PD-1 y la expresión de IL-15. Por un lado, se ha destacado que las terapias dirigidas únicamente al bloqueo de PD-1 no son suficientes para conseguir respuestas inmunitarias y mejorar la eficacia de los tratamientos [67] donde se sugiere el uso de una estrategia adicional, con compuestos capaces de activar rutas metabólicas clave [37][318]. En este caso, IL-15 sería de interés ya que es una citocina que está involucrada en este tipo de rutas metabólicas y su señalización [88][97][99]. Además, de igual manera, el uso de IL-15 como monoterapia tampoco ha resultado ser suficiente [98][329], sugiriéndose en varias ocasiones su combinación con estrategias inhibitoras de puntos de control [93][98]. Tomando ventaja de estos datos, nuestra estrategia va más allá, permitiendo la expresión de IL-15 bajo el promotor endógeno de *PDCD1* y, por tanto, una expresión controlada, evitando así los posibles efectos negativos derivados de la misma.

El uso conjunto del complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  es una estrategia común de las monoterapias de IL-15, donde se ha visto que el uso único de IL-15 es ineficiente [324]. Sería interesante utilizar el constructo heterodimérico IL-15/IL-15R $\alpha$  para generar pdTRUCKIL-15/IL-15R $\alpha$  y realizar los mismos estudios para testear, si de esta manera, se magnifican los efectos de IL-15 sobre las células T, ya que su señalización principalmente involucra al complejo IL-15/IL-15R $\alpha$ . Por ende, el uso de este complejo podría desencadenar respuestas más tóxicas debido a su mayor afinidad por el receptor IL-2/IL-15R $\beta$ / $\gamma$ c que la de IL-15 por sí sola [22][25].

A pesar de todos estos prometedores resultados, es necesario realizar un estudio exhaustivo de los posibles efectos tóxicos derivados de la expresión de IL-15 porque a pesar de estar controlada bajo el promotor endógeno de *PDCD1*, podría dar lugar a efectos no deseados como la autoinmunidad o desarrollo de leucemias [89] que requieren ser estudiados. Además, esta línea de trabajo se beneficiaría de la realización de experimentos *in vivo* para estudiar cómo se comportan las células pdTRUCKIL-15 en un entorno más real y poder validar esta estrategia. Independientemente, creemos que los datos presentados en esta tesis doctoral evidencian el **gran potencial de esta plataforma de edición genómica del gen *PDCD1* y expresión controlada de IL-15 en las células CAR-T**, confiriendo **propiedades inmunoterapéuticas bastante prometedoras** junto con una **mayor aptitud celular** para luchar contra linfomas y tumores sólidos positivos para PD-L1.



## CONCLUSIONES

---

1. El *Knock-out* de PD-1 reduce la capacidad proliferativa y mitocondrial de las células CAR-T.
2. La sobreexpresión de PD-L1 en células Namalwa no altera significativamente la proliferación ni la capacidad de formación de tumores en modelos animales, validándolas como un modelo para analizar el efecto del eje PD-1/PD-L1 en estrategias antitumorales.
3. Las células CAR-T PD-1 KO muestran una actividad lítica y persistencia mejoradas frente a células tumorales PD-L1+ en comparación con las células CAR-T WT.
4. Los AAV6 son los vectores seleccionados como herramienta de entrega del ADN donador a células T para generar el producto pdTRUCKIL-15.
5. Se ha desarrollado una plataforma que permite de manera simultánea la eliminación del gen *PDCD1* y la expresión controlada de IL-15 en células CAR-T, generando el producto pdTRUCKIL-15.
6. La expresión de IL-15 mimetiza el patrón de expresión de PD-1 en las células pdTRUCKIL-15 sugiriendo, por tanto, que está determinada por el promotor endógeno de PD-1.
7. La expresión de IL-15 en las células pdTRUCKIL-15 restaura la proliferación y capacidad metabólica de las células CAR-T PD-1 KO, promoviendo por tanto una actividad lítica y capacidad de persistencia incrementadas.



## CONCLUSIONS

---

1. The PD-1 *knock-out* diminishes the proliferative and mitochondrial capacity of edited CAR-T cells.
2. The overexpression of PD-L1 in Namalwa cells does not significantly alter proliferation or tumour progression capacity in animal models, validating them as a model for analysing the effect of PD-1/PD-L1 axis in antitumor strategies.
3. CAR-T PD-1 KO cells exhibit enhanced lytic activity and persistence capacity against PD-L1+ tumor cells compared to CAR-T WT cells.
4. AAV6 vectors have been selected as the delivery tool for carrying out HDR in *PDCD1* locus to generate the pdTRUCKIL-15 product.
5. A new platform has been developed that simultaneously allows the deletion of the *PDCD1* gene and a controlled expression of IL-15 in CAR-T cells, generating the pdTRUCKIL-15 product.
6. IL-15 expression mimics the expression pattern of PD-1 in pdTRUCKIL-15 cells, suggesting that it is determined by the endogenous PD-1 promoter.
7. IL-15 expression in pdTRUCKIL-15 cells restores the dismissed proliferation and metabolic capacity observed in CAR-T PD-1 KO cells, thereby promoting increased lytic activity and persistence.



# BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] S. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, *Inmunología celular y molecular (Edición 10th)*. 2022.
- [2] V. M. David Male, R. Stokes Peebles Fr., *Inmunología (Edición 9th)*. Elsevier Limited (UK). 2021.
- [3] P. . I. Abbas AK, Lichtman H, *Inmunología básica (Edición 6th)*. 2020.
- [4] J. S. Booth and F. R. Toapanta, "B and T cell immunity in tissues and across the ages," *Vaccines*, vol. 9, no. 1, pp. 1–25, 2021.
- [5] J. K. Actor, "T-Cell Immunity," *Elsevier's Integr. Rev. Immunol. Microbiol.*, pp. 25–32, 2012.
- [6] E. Proverb, "T Cell Development, Activation and Effector Functions," *Prim. to Immune Response*, pp. 197–226, 2014.
- [7] J. S. Dolina, N. Van Braeckel-Budimir, G. D. Thomas, and S. Salek-Ardakani, "CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer," *Front. Immunol.*, vol. 12, no. July, pp. 1–13, 2021.
- [8] L. Biasco *et al.*, "Clonal expansion of T memory stem cells determines early anti-leukemic responses and long-term CAR T cell persistence in patients," *Nat. Cancer*, vol. 2, no. 6, pp. 629–642, 2021.
- [9] L. Gattinoni *et al.*, "A human memory T cell subset with stem cell-like properties," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 10, pp. 1290–1297, 2011.
- [10] H. A. Abdelsamed *et al.*, "Human memory CD8 T cell effector potential is epigenetically preserved during in vivo homeostasis," *J. Exp. Med.*, vol. 214, no. 6, pp. 1593–1606, 2017.
- [11] D. M. Moskowitz *et al.*, "Epigenomics of human CD8 T cell differentiation and aging," *Sci. Immunol.*, vol. 2, no. 8, pp. 1–29, 2017.
- [12] P. Waring and A. Müllbacher, "Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 77, no. 4, pp. 312–317, 1999.
- [13] H. Jiang, "Investigating the role of," no. September. pp. 1–230, 2015.
- [14] G. P. Mognol *et al.*, "Targeting the NFAT:AP-1 transcriptional complex on DNA with a small-molecule inhibitor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 20, pp. 9959–9968, 2019.
- [15] A. G. Papavassiliou and A. M. Musti, "The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation and Exhaustion," *Cells*, vol. 9, no. 11, 2020.
- [16] R. J. Salmond, "mTOR regulation of glycolytic metabolism in T cells," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 6, no. SEP, pp. 1–9, 2018.
- [17] H. Mohimani *et al.*, "mTORC1 and mTORC2 Kinase Signaling and Glucose Metabolism Drive Follicular Helper T Cell Differentiation Hu," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017.
- [18] J. A. Shyer, R. A. Flavell, and W. Bailis, "Metabolic signaling in T cells," *Cell Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 649–659, 2020.
- [19] A. Avagliano *et al.*, "Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. May, pp. 1–21, 2020.
- [20] X. Hu, J. li, M. Fu, X. Zhao, and W. Wang, "The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, 2021.
- [21] and J. J. O. Alejandro V. Villarino, Yuka Kanno, "Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease

- Alejandro," *J Immunol*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2016.
- [22] L. M. McLane *et al.*, "Differential Localization of T-bet and Eomes in CD8 T Cell Memory Populations," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 7, pp. 3207–3215, 2013.
- [23] J.-A. L. Kelsey C. Martin Mhatre V. Ho and and D. M. Y. A. M. Kevin Range, "Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [24] J. Zhang *et al.*, "Sequential actions of EOMES and T-BET promote stepwise maturation of natural killer cells," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–17, 2021.
- [25] J. Blagih *et al.*, "The Energy Sensor AMPK Regulates T Cell Metabolic Adaptation and Effector Responses InVivo," *Immunity*, vol. 42, no. 1, pp. 41–54, 2015.
- [26] C. L. Kuo *et al.*, "Mitochondrial oxidative stress in the tumor microenvironment and cancer immunoescape: foe or friend?," *J. Biomed. Sci.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–25, 2022.
- [27] L. M. McLane, M. S. Abdel-Hakeem, and E. J. Wherry, "CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 37, pp. 457–495, 2019.
- [28] E. L. Pearce, M. C. Poffenberger, C. H. Chang, and R. G. Jones, "Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function," *Science (80-. )*, vol. 342, no. 6155, 2013.
- [29] L. Jia, L. Zhang, M. Liu, H. Ji, Z. Wen, and C. Wang, "Mitochondrial Control for Healthy and Autoimmune T Cells," *Cells*, vol. 12, no. 13, pp. 1–19, 2023.
- [30] A. E. Brunell, R. Lahesmaa, A. Autio, and A. K. Thotakura, "Exhausted T cells hijacking the cancer-immunity cycle: Assets and liabilities," *Front. Immunol.*, vol. 14, no. April, pp. 1–13, 2023.
- [31] F. Li, H. Liu, D. Zhang, Y. Ma, and B. Zhu, "Metabolic plasticity and regulation of T cell exhaustion," *Immunology*, vol. 167, no. 4, pp. 482–494, 2022.
- [32] N. Jones *et al.*, "Akt and STAT5 mediate naïve human CD4+ T-cell early metabolic response to TCR stimulation," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 152–160, 2019.
- [33] L. A. J. O'Neill, R. J. Kishton, and J. Rathmell, "A guide to immunometabolism for immunologists," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 9, pp. 553–565, 2016.
- [34] Z. Hu, Q. Zou, and B. Su, "Regulation of T cell immunity by cellular metabolism," *Front. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 463–472, 2018.
- [35] L. Xia *et al.*, "The cancer metabolic reprogramming and immune response," *Mol. Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 1–21, 2021.
- [36] N. M. Chapman, M. R. Boothby, and H. Chi, "Metabolic coordination of T cell quiescence and activation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 1, pp. 55–70, 2020.
- [37] I. Flati *et al.*, "Molecular Mechanisms Underpinning Immunometabolic Reprogramming: How the Wind Changes during Cancer Progression," *Genes (Basel)*, vol. 14, no. 10, 2023.
- [38] H. Kurniawan, L. Soriano-Bagué, and D. Brenner, "Regulatory T cell metabolism at the intersection between autoimmune diseases and cancer," *Eur. J. Immunol.*, vol. 50, no. 11, pp. 1626–1642, 2020.
- [39] L. A. Sena *et al.*, "Mitochondria Are Required for Antigen-Specific T Cell Activation through Reactive Oxygen Species Signaling," *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 225–236, 2013.
- [40] X. L. and G. Peng, "Mitochondria orchestrate T cell fate and function," *Nat. Immunol.*, vol. 22, no. 3, pp. 266–268, 2021.
- [41] W. Li *et al.*, "Cell metabolism-based optimization strategy of CAR-T cell function in cancer therapy," *Front.*

*Immunol.*, vol. 14, no. June, pp. 1–16, 2023.

- [42] H. Wei *et al.*, “Cutting Edge: Foxp1 Controls Naive CD8+ T Cell Quiescence by Simultaneously Repressing Key Pathways in Cellular Metabolism and Cell Cycle Progression,” *J. Immunol.*, vol. 196, no. 9, pp. 3537–3541, 2016.
- [43] S. Zhang *et al.*, “Newly Generated CD4+ T Cells Acquire Metabolic Quiescence after Thymic Egress,” *J. Immunol.*, vol. 200, no. 3, pp. 1064–1077, 2018.
- [44] C. H. Chang *et al.*, “Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis,” *Cell*, vol. 153, no. 6, p. 1239, 2013.
- [45] R. I. K. Geltink, R. L. Kyle, and E. L. Pearce, “Unraveling the Complex Interplay between T Cell Metabolism and Function,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 36, pp. 461–488, 2018.
- [46] Z. Zhang *et al.*, “Metformin Enhances the Antitumor Activity of CD8+ T Lymphocytes via the AMPK–miR-107–Eomes–PD-1 Pathway,” *J. Immunol.*, vol. 204, no. 9, pp. 2575–2588, 2020.
- [47] A. T. Phan *et al.*, “Constitutive Glycolytic Metabolism Supports CD8+ T Cell Effector Memory Differentiation during Viral Infection,” *Immunity*, vol. 45, no. 5, pp. 1024–1037, 2016.
- [48] T. Kondo *et al.*, “The NOTCH–FOXO1 axis plays a key role in mitochondrial biogenesis in the induction of human stem cell memory–like CAR-T cells,” *Cancer Res.*, vol. 80, no. 3, pp. 471–483, 2020.
- [49] K. Pilipow *et al.*, “Antioxidant metabolism regulates CD8+ T memory stem cell formation and antitumor immunity,” *JCI insight*, vol. 3, no. 18, 2018.
- [50] F. Flores-Borja and P. Blair, “Mechanisms of induction of regulatory B cells in the tumour microenvironment and their contribution to immunosuppression and pro-tumour responses,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 209, no. 1, pp. 33–45, 2022.
- [51] Y. Togashi, K. Shitara, and H. Nishikawa, “Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 6, pp. 356–371, 2019.
- [52] J. C. Beltra *et al.*, “Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms,” *Immunity*, vol. 52, no. 5, pp. 825–841.e8, 2020.
- [53] X. J. Guo *et al.*, “CTLA-4 Synergizes With PD1/PD-L1 in the Inhibitory Tumor Microenvironment of Intrahepatic Cholangiocarcinoma,” *Front. Immunol.*, vol. 12, no. August, pp. 1–11, 2021.
- [54] B. Mollavelioglu *et al.*, “High co-expression of immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, and TIGIT on tumor-infiltrating lymphocytes in early-stage breast cancer,” *World J. Surg. Oncol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–13, 2022.
- [55] F. Wang *et al.*, “PD-L1 regulates cell proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia by activating PI3K-AKT signaling pathway,” *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2022.
- [56] H. Li *et al.*, “Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma,” *Cell*, vol. 176, no. 4, pp. 775–789.e18, 2019.
- [57] N. R. Maimela, S. Liu, and Y. Zhang, “Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 17, pp. 1–13, 2019.
- [58] C. U. Blank *et al.*, “Defining ‘T cell exhaustion,’” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 11, pp. 665–674, 2019.
- [59] D. S. Thommen and T. N. Schumacher, “T Cell Dysfunction in Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 33, no. 4, pp. 547–562, 2018.
- [60] O. Khan *et al.*, “TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion,” *Nature*, vol. 571, no. 7764, pp. 211–218, 2019.

- [61] R. C. Lynn *et al.*, "c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance," *Nature*, vol. 576, no. 7786, pp. 293–300, 2019.
- [62] A. Tsumura, D. Levis, and J. M. Tuscano, "Checkpoint inhibition in hematologic malignancies," *Front. Oncol.*, vol. 13, no. October, pp. 1–22, 2023.
- [63] J. Xu and C. Mechanisms, *Advances in Experimental Medicine and Biology 1248 Regulation of Cancer Immune Checkpoints*. 2018.
- [64] Y. J. Zhou *et al.*, "PD-L1: expression regulation," *Blood Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 77–91, 2023.
- [65] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo, "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death.," *EMBO J.*, vol. 11, no. 11, pp. 3887–3895, 1992.
- [66] C. C. Stamper *et al.*, "Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses," *Nature*, vol. 410, no. 6828, pp. 608–611, 2001.
- [67] A. H. Sharpe and K. E. Pauken, "The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 3, pp. 153–167, 2018.
- [68] L. Heim *et al.*, "NFATc1 promotes antitumoral effector functions and memory CD8+ t-cell differentiation during non-small cell lung cancer development," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 13, pp. 3619–3633, 2018.
- [69] F. A. Schildberg, S. R. Klein, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe, "Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family," *Immunity*, vol. 44, no. 5, pp. 955–972, 2016.
- [70] Y. Fu *et al.*, "Glycogen synthase kinase 3 controls T-cell exhaustion by regulating NFAT activation," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 20, no. 10, pp. 1127–1139, 2023.
- [71] E. Hui *et al.*, "T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition," *Science (80-. )*, vol. 355, no. 6332, pp. 1428–1433, 2017.
- [72] V. Pietrobon, L. A. Todd, A. Goswami, O. Stefanson, Z. Yang, and F. Marincola, "Improving car t-cell persistence," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 19, pp. 1–27, 2021.
- [73] K. A. Hofmeyer, H. Jeon, and X. Zang, "The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011.
- [74] X. Jiang *et al.*, "Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape," *Mol. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–17, 2019.
- [75] M. Bettonville *et al.*, "Long-term antigen exposure irreversibly modifies metabolic requirements for T cell function," *Elife*, vol. 7, pp. 1–24, 2018.
- [76] D. Sugiura *et al.*, "Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses," *Science (80-. )*, vol. 364, no. 6440, pp. 558–566, 2019.
- [77] A. Tedgui and H. Ait-Oufella, *Innate Lymphoid Cells*, vol. 33, no. 12. 2013.
- [78] C. J. Dwyer *et al.*, "Fueling cancer immunotherapy with common gamma chain cytokines," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. FEB, pp. 1–18, 2019.
- [79] I. Castro, A. Yu, M. J. Dee, and T. R. Malek, "The Basis of Distinctive IL-2– and IL-15–Dependent Signaling: Weak CD122-Dependent Signaling Favors CD8+ T Central-Memory Cell Survival but Not T Effector-Memory Cell Development," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 10, pp. 5170–5182, 2011.
- [80] B. Hu *et al.*, "Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18," *Cell Rep.*, vol. 20, no. 13, pp. 3025–3033, 2017.
- [81] K. Warner, M. Ghaedi, D. C. Chung, N. Jacquilot, and P. S. Ohashi, "Innate lymphoid cells in early tumor

- development," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. August, pp. 1–13, 2022.
- [82] K. Yasuda, K. Nakanishi, and H. Tsutsui, "Interleukin-18 in health and disease," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 3, 2019.
- [83] S. Tugues *et al.*, "New insights into IL-12-mediated tumor suppression," *Cell Death Differ.*, vol. 22, no. 2, pp. 237–246, 2015.
- [84] D. A. A. Vignali and V. K. Kuchroo, "IL-12 family cytokines: immunological playmakers," *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 8, pp. 722–728, 2012.
- [85] J. Zhao, J. Zhao, and S. Perlman, "Differential Effects of IL-12 on Tregs and Non-Treg T Cells: Roles of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-2R," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [86] Y. Zheng *et al.*, "Role of interleukin-12 gene polymorphisms in the onset risk of cancer: A meta-analysis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 18, pp. 29795–29807, 2017.
- [87] L. K. Dickerson, J. A. Carter, K. Kohli, and V. G. Pillarisetty, "Emerging interleukin targets in the tumour microenvironment: implications for the treatment of gastrointestinal tumours," *Gut*, vol. 72, no. 8, pp. 1592–1606, 2023.
- [88] F. Watkinson *et al.*, "IL-15 Upregulates Telomerase Expression and Potently Increases Proliferative Capacity of NK, NKT-Like, and CD8 T Cells," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. January, p. 594620, 2020.
- [89] Y. Zhou *et al.*, "Interleukin 15 in Cell-Based Cancer Immunotherapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 13, pp. 1–20, 2022.
- [90] N. D. Huntington *et al.*, "IL-15 transpresentation promotes both human T-cell reconstitution and T-cell-dependent antibody responses in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 15, pp. 6217–6222, 2011.
- [91] P. F. Fiore *et al.*, "Interleukin-15 and cancer: Some solved and many unsolved questions," *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, no. 2, 2020.
- [92] A. Mishra, L. Sullivan, and M. A. Caligiuri, "Molecular pathways: Interleukin-15 signaling in health and in cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 2044–2050, 2014.
- [93] R. Fujii, C. Jochems, S. R. Tritsch, H. C. Wong, J. Schlom, and J. W. Hodge, "An IL-15 superagonist/IL-15R $\alpha$  fusion complex protects and rescues NK cell-cytotoxic function from TGF- $\beta$ 1-mediated immunosuppression," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 67, no. 4, pp. 675–689, 2018.
- [94] M. J. Szczepanski, M. Szajnik, A. Welsh, K. A. Foon, T. L. Whiteside, and M. Boyiadzis, "Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 59, no. 1, pp. 73–79, 2010.
- [95] M. Zhang *et al.*, "IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 46, pp. E10915–E10924, 2018.
- [96] N. D. Huntington *et al.*, "Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 8, pp. 856–863, 2007.
- [97] A. Xu *et al.*, "IL-15 signaling promotes adoptive effector T-cell survival and memory formation in irradiation-induced lymphopenia," *Cell Biosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, 2016.
- [98] T. A. Waldmann, S. Dubois, M. D. Miljkovic, and K. C. Conlon, "IL-15 in the Combination Immunotherapy of Cancer," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. May, 2020.
- [99] D. Briukhovetska, J. Dörr, S. Endres, P. Libby, C. A. Dinarello, and S. Kobold, "Interleukins in cancer: from biology to therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 21, no. 8, pp. 481–499, 2021.
- [100] M. Lochner, L. Berod, and T. Sparwasser, "Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function," *Trends*

- Immunol.*, vol. 36, no. 2, pp. 81–91, 2015.
- [101] Y. T. Chan *et al.*, “Immune Checkpoint Molecules and Glucose Metabolism in HIV-Induced T Cell Exhaustion,” *Biomedicines*, vol. 10, no. 11, 2022.
- [102] P. Tripathi *et al.*, “STAT5 Is Critical To Maintain Effector CD8+ T Cell Responses,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 4, pp. 2116–2124, 2010.
- [103] M. H. Amani Makkouk, Xue (Cher) Yang, Taylor Barca, Anthony Lucas, Mustafa Turkoz, Jonathan T S Wong, Kevin P Nishimoto, Mary M Brodey, Maryam Tabrizizad, Smitha R Y Gundurao, Lu Bai, Arun Bhat, Zili An, Stewart Abbot, Daulet Satpayev, Blake T Aftab, “Off-the-shelf V $\delta$ 1 gamma delta T cells engineered with glyp.pdf.” 2021.
- [104] R. M. Santana Carrero *et al.*, “IL-15 is a component of the inflammatory milieu in the tumor microenvironment promoting antitumor responses,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 2, pp. 599–608, 2019.
- [105] S. L. Park *et al.*, “Tissue-resident memory CD8+ T cells promote melanoma–immune equilibrium in skin,” *Nature*, vol. 565, no. 7739, pp. 366–371, 2019.
- [106] C. H. June, R. S. O’Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, and M. C. Milone, “CAR T cell immunotherapy for human cancer,” *Science (80-. )*, vol. 359, no. 6382, pp. 1361–1365, 2018.
- [107] J. Zarychta, A. Kowalczyk, M. Krawczyk, M. Lejman, and J. Zawitkowska, “CAR-T Cells Immunotherapies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia—Recent Advances,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 11, 2023.
- [108] F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves, K. Serre, and M. J. Oliveira, “Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAY, pp. 1–19, 2018.
- [109] R. Kim, “Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape,” *Cancer Immunother. Immune Suppr. Tumor Growth*, vol. 3, no. 11, pp. 9–27, 2007.
- [110] S. Van Schandevyl and T. Kerre, “Chimeric antigen receptor T-cell therapy: design improvements and therapeutic strategies in cancer treatment,” *Acta Clin. Belgica Int. J. Clin. Lab. Med.*, vol. 75, no. 1, pp. 26–32, 2020.
- [111] H. Gonzalez, C. Hagerling, and Z. Werb, “Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression,” *Genes Dev.*, vol. 32, no. 19–20, pp. 1267–1284, 2018.
- [112] G. L. Beatty and W. L. Gladney, “Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 687–692, 2015.
- [113] G. W. Tormoen, M. R. Crittenden, and M. J. Gough, “Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy,” *Adv. Radiat. Oncol.*, vol. 3, no. 4, pp. 520–526, 2018.
- [114] L. P. Andrews, H. Yano, and D. A. A. Vignali, “Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups,” *Nat. Immunol.*, vol. 20, no. 11, pp. 1425–1434, 2019.
- [115] J. M. Taube *et al.*, “Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 127, 2012.
- [116] B. Mirlekar and Y. Pylayeva-Gupta, “IL-12 family cytokines in cancer and immunotherapy,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 2, pp. 1–23, 2021.
- [117] A. Alnefaie *et al.*, “Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, no. June, pp. 1–32, 2022.
- [118] V. Romano *et al.*, “Influence of tumor microenvironment and fibroblast population plasticity on melanoma growth, therapy resistance and immunoescape,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 10, pp. 1–24, 2021.

- [119] C. Yunna, H. Mengru, W. Lei, and C. Weidong, "Macrophage M1/M2 polarization," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 877, no. March, p. 173090, 2020.
- [120] M. R. Ruocco *et al.*, "Metabolic flexibility in melanoma: A potential therapeutic target," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 59, pp. 187–207, 2019.
- [121] P. C. Ho *et al.*, "Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses," *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1217–1228, 2015.
- [122] K. Pavlovic *et al.*, "Using Gene Editing Approaches to Fine-Tune the Immune System," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. September, pp. 1–13, 2020.
- [123] N. Tokarew, J. Ogonek, S. Endres, M. von Bergwelt-Baildon, and S. Kobold, "Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells," *Br. J. Cancer*, vol. 120, no. 1, pp. 26–37, 2019.
- [124] C. Aparicio-Pérez, Md. Carmona, K. Benabdellah, and C. Herrera, "Failure of ALL recognition by CAR T cells: a review of CD 19-negative relapses after anti-CD 19 CAR-T treatment in B-ALL," *Front. Immunol.*, vol. 14, no. April, pp. 1–18, 2023.
- [125] I. Caruana, I. Diaconu, and G. Dotti, "From monoclonal antibodies to chimeric antigen receptors for the treatment of human malignancies," *Semin. Oncol.*, vol. 41, no. 5, pp. 661–666, 2014.
- [126] Y. Liu *et al.*, "Development of a Bispecific Nanobody Targeting CD20 on B-Cell Lymphoma Cells and CD3 on T Cells," *Vaccines*, vol. 10, no. 8, 2022.
- [127] M. Klinger *et al.*, "Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab," *Blood*, vol. 119, no. 26, pp. 6226–6233, 2012.
- [128] D. S. Chen and I. Mellman, "Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle," *Immunity*, vol. 39, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [129] W. Dong *et al.*, "The mechanism of anti-pd-l1 antibody efficacy against pd-l1-negative tumors identifies nk cells expressing pd-l1 as a cytolytic effector," *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 10, pp. 1422–1437, 2019.
- [130] R. S. Herbst *et al.*, "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients," *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 563–567, 2014.
- [131] S. N. Gettinger *et al.*, "Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 18, pp. 2004–2012, 2015.
- [132] O. Hamid *et al.*, "Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 2, pp. 134–144, 2013.
- [133] Y. Lu, X. Zhang, J. Ning, and M. Zhang, "Immune checkpoint inhibitors as first-line therapy for non-small cell lung cancer: A systematic evaluation and meta-analysis," *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–15, 2023.
- [134] C. S. Chiang *et al.*, "Combination of fucoidan-based magnetic nanoparticles and immunomodulators enhances tumour-localized immunotherapy," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 13, no. 8, pp. 746–754, 2018.
- [135] Y. Xu, C. Chen, Y. Guo, S. Hu, and Z. Sun, "Effect of CRISPR/Cas9-Edited PD-1/PD-L1 on Tumor Immunity and Immunotherapy," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. March, pp. 1–14, 2022.
- [136] M. Chmielewski and H. Abken, "TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation," *Adv. Cell Gene Ther.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–9, 2020.
- [137] A. E. Wight *et al.*, "Antibody-mediated blockade of the IL23 receptor destabilizes intratumoral regulatory T cells and enhances immunotherapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 119, no. 18, pp. 1–8, 2022.

- [138] A. Hu *et al.*, "Intra-Tumoral Delivery of IL-27 Using Adeno-Associated Virus Stimulates Anti-tumor Immunity and Enhances the Efficacy of Immunotherapy," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. March, pp. 1–10, 2020.
- [139] O. Kourko, K. Seaver, N. Odoardi, S. Basta, and K. Gee, "IL-27, IL-30, and IL-35: A Cytokine Triumvirate in Cancer," *Front. Oncol.*, vol. 9, no. October, pp. 1–15, 2019.
- [140] H. Xiao *et al.*, "IL-39 reduces proliferation and promotes apoptosis of bladder cancer by altering the activity of cyclin e and fas," *Anticancer Res.*, vol. 41, no. 5, pp. 2239–2245, 2021.
- [141] "Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer.pdf." .
- [142] S. E. Fenton, D. Saleiro, and L. C. Platanius, "Type i and ii interferons in the anti-tumor immune response," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 5, pp. 1–19, 2021.
- [143] S. K. Perna *et al.*, "Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: Implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 106–117, 2013.
- [144] C. Sakellariou *et al.*, "Prostate cancer cells enhance interleukin-15-mediated expansion of NK cells," *BJU Int.*, vol. 125, no. 1, pp. 89–102, 2020.
- [145] G. Bindea, B. Mlecnik, and J. Galon, "Expand to shield: IL-15 and in situ lymphocytic proliferation," *Oncoimmunology*, vol. 10, no. 1, pp. 15–17, 2021.
- [146] A. E. H. El-Kadiry, M. Rafei, and R. Shammaa, "Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits," *Front. Med.*, vol. 8, no. November, pp. 1–24, 2021.
- [147] U. Dafni *et al.*, "Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: A systematic review and meta-analysis," *Ann. Oncol.*, vol. 30, no. 12, pp. 1902–1913, 2019.
- [148] J. Saura-Esteller *et al.*, "Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. June, pp. 1–11, 2022.
- [149] S. Prockop *et al.*, "Off-the-shelf EBV-specific T cell immunotherapy for rituximab-refractory EBV-associated lymphoma following transplantation," *J. Clin. Invest.*, vol. 130, no. 2, pp. 733–747, 2020.
- [150] Y. Liu *et al.*, "TCR-T Immunotherapy: The Challenges and Solutions," *Front. Oncol.*, vol. 11, no. January, pp. 1–14, 2022.
- [151] E. Baulu, C. Gardet, N. Chuvin, and S. Depil, "TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives," *Sci. Adv.*, vol. 9, no. 7, pp. 1–15, 2023.
- [152] A. Han, J. Glanville, L. Hansmann, and M. M. Davis, "Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 7, pp. 684–692, 2014.
- [153] P. Zhang, G. Zhang, and X. Wan, "Challenges and new technologies in adoptive cell therapy," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–55, 2023.
- [154] R. A. Morgan *et al.*, "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes," *Science (80- )*, vol. 314, no. 5796, pp. 126–129, 2006.
- [155] S. Mantovani *et al.*, "An anti-mica/b antibody and il-15 rescue altered nkg2d-dependent nk cell responses in hepatocellular carcinoma," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–15, 2020.
- [156] D. Wu and Y. Li, "Application of adoptive cell therapy in hepatocellular carcinoma," *Immunology*, vol. 170, no. 4, pp. 453–469, 2023.
- [157] S. Mahgoub, H. Abosalem, M. Emara, N. Kotb, A. Maged, and S. Soror, "Restoring NK cells functionality via cytokine activation enhances cetuximab-mediated NK-cell ADCC: A promising therapeutic tool for HCC patients," *Mol. Immunol.*, vol. 137, no. July, pp. 221–227, 2021.

- [158] K. M. Maalej *et al.*, “CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances,” *Mol. Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. 1–54, 2023.
- [159] D. M. Dogbey *et al.*, “Technological advances in the use of viral and non-viral vectors for delivering genetic and non-genetic cargos for cancer therapy,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 2719–2738, 2023.
- [160] J. T. Bulcha, Y. Wang, H. Ma, P. W. L. Tai, and G. Gao, “Viral vector platforms within the gene therapy landscape,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, 2021.
- [161] H. As-, H. States, S. Raffel, D. Hypersensitiv, R. E. Billingham, and M. Grodsky, “Adenovirus-Associated Defective Virus Particles,” vol. 149, 1965.
- [162] M. F. Naso, B. Tomkowicz, W. L. Perry, and W. R. Strohl, “Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy,” *BioDrugs*, vol. 31, no. 4, pp. 317–334, 2017.
- [163] D. H. Bryant *et al.*, “Deep diversification of an AAV capsid protein by machine learning,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 39, no. 6, pp. 691–696, 2021.
- [164] S. Russell *et al.*, “Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial,” *Lancet*, vol. 390, no. 10097, pp. 849–860, 2017.
- [165] J. R. Mendell *et al.*, “Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 18, pp. 1713–1722, 2017.
- [166] T. M. Letter, “Valoctocogene Roxaparvovec (Roctavian) – A Gene Therapy for Severe Hemophilia A,” *Med. Lett. Drugs Ther.*, vol. 65, no. 1686, pp. 157–158, 2023.
- [167] 7 Dan Wang<sup>1, 2</sup>, Feng Zhang<sup>3, 4, 5</sup>, Guangping Gao<sup>1, 6</sup>, “CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors,” *Cell.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2020.
- [168] K. Benabdellah *et al.*, “Genome-edited adult stem cells: Next-generation advanced therapy medicinal products,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 674–685, 2020.
- [169] K. S. Hanlon *et al.*, “High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [170] M. Cortijo-Gutiérrez *et al.*, “Improved functionality of integration-deficient lentiviral vectors (IDLVs) by the inclusion of IS2 protein docks,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, pp. 2–5, 2021.
- [171] M. C. Milone and U. O’Doherty, “Clinical use of lentiviral vectors,” *Leukemia*, vol. 32, no. 7, pp. 1529–1541, 2018.
- [172] S. Durand and A. Cimarelli, “The Inside out of Lentiviral Vectors,” *Viruses*, vol. 3, no. 2, pp. 132–159, 2011.
- [173] J. Tian and S. T. Andreadis, “Independent and high-level dual-gene expression in adult stem-progenitor cells from a single lentiviral vector,” *Gene Ther.*, vol. 16, no. 7, pp. 874–884, 2009.
- [174] J. Hu *et al.*, “A Non-integrating Lentiviral Approach Overcomes Cas9-Induced Immune Rejection to Establish an Immunocompetent Metastatic Renal Cancer Model,” *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 9, no. June, pp. 203–210, 2018.
- [175] S. Ferrari *et al.*, “Choice of template delivery mitigates the genotoxic risk and adverse impact of editing in human hematopoietic stem cells,” *Cell Stem Cell*, vol. 29, no. 10, pp. 1428–1444.e9, 2022.
- [176] M. Cortijo-Gutiérrez *et al.*, “Improved functionality of integration-deficient lentiviral vectors (IDLVs) by the inclusion of IS2 protein docks,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, pp. 1–17, 2021.
- [177] M. Khoshandam, H. Soltaninejad, M. Mousazadeh, A. A. Hamidieh, and S. Hosseinkhani, “Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine,” *Genes Dis.*, vol. 11, no. 1, pp. 268–282, 2023.

- [178] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, and D. G. Anderson, "Non-viral vectors for gene-based therapy," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 8, pp. 541–555, 2014.
- [179] J. van der Oost and C. Patinios, "The genome editing revolution," *Trends Biotechnol.*, vol. 41, no. 3, pp. 396–409, 2023.
- [180] C. E. Dumeau, A. Monfort, L. Kissling, D. C. Swarts, M. Jinek, and A. Wutz, "Introducing gene deletions by mouse zygote electroporation of Cas12a/Cpf1," *Transgenic Res.*, vol. 28, no. 5–6, pp. 525–535, 2019.
- [181] X. Gong, Z. Chen, J. J. Hu, and C. Liu, "Advances of Electroporation-Related Therapies and the Synergy with Immunotherapy in Cancer Treatment," *Vaccines*, vol. 10, no. 11, pp. 1–18, 2022.
- [182] H. Kavanagh *et al.*, "A novel non-viral delivery method that enables efficient engineering of primary human T cells for ex vivo cell therapy applications," *Cytotherapy*, vol. 23, no. 9, pp. 852–860, 2021.
- [183] L. Duan *et al.*, "Nanoparticle Delivery of CRISPR/Cas9 for Genome Editing," *Front. Genet.*, vol. 12, no. May, 2021.
- [184] C. Hald Albertsen, J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, M. Lind, K. Petersson, and J. B. Simonsen, "The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 188, p. 114416, 2022.
- [185] M. L. Santana-Armas and C. Tros de Ilarduya, "Strategies for cancer gene-delivery improvement by non-viral vectors," *Int. J. Pharm.*, vol. 596, p. 120291, 2021.
- [186] K. Li and B. Liu, "Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 18, pp. 6570–6597, 2014.
- [187] X. Liu *et al.*, "Improving Editing Efficiency for the Sequences with NGH PAM Using xCas9-Derived Base Editors," *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 17, no. September, pp. 626–635, 2019.
- [188] A. V. Anzalone *et al.*, "Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA," *Nature*, vol. 576, no. 7785, pp. 149–157, 2019.
- [189] Z. Zhao, P. Shang, P. Mohanraju, and N. Geijsen, "Prime editing: advances and therapeutic applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 41, no. 8, pp. 1000–1012, 2023.
- [190] Y. Fu *et al.*, "Prime editing: current advances and therapeutic opportunities in human diseases," *Sci. Bull.*, no. xxxx, 2023.
- [191] S. Ding, J. Liu, X. Han, and M. Tang, "CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Cancer Therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 22, p. 16325, 2023.
- [192] J. P. Zhang *et al.*, "Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage," *Genome Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–18, 2017.
- [193] W. Bai, M. Huang, C. Li, and J. Li, "The biological principles and advanced applications of DSB repair in CRISPR-mediated yeast genome editing," *Synth. Syst. Biotechnol.*, vol. 8, no. 4, pp. 584–596, 2023.
- [194] C.-H. Lau, C. Tin, and Y. Suh, "CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction," *Fac. Rev.*, vol. 9, no. 20, 2020.
- [195] F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, and P. D. Gregory, "Genome editing with engineered zinc finger nucleases," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 9, pp. 636–646, 2010.
- [196] N. Sun and H. Zhao, "Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 7, pp. 1811–1821, 2013.
- [197] R. Zheng *et al.*, "Progress and Perspective of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Medicine," *Adv. Sci.*, vol. 10, no. 25, 2023.

- [198] S. Zhang *et al.*, “Current trends of clinical trials involving CRISPR/Cas systems,” *Front. Med.*, vol. 10, no. November, pp. 1–18, 2023.
- [199] A. Philippidis, “CRISPR Therapeutics, Vertex Complete Rolling Biologics License Applications for Exa-Cel in Sickle Cell Disease, Beta Thalassemia,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 34, no. 9–10, pp. 341–344, 2023.
- [200] P. Horvath and R. Barrangou, “CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea,” *Science (80-. )*, vol. 327, no. 5962, pp. 167–170, 2010.
- [201] Z. Bao *et al.*, “Genome-scale engineering of *Saccharomyces cerevisiae* with single-nucleotide precision,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 6, pp. 505–508, 2018.
- [202] A. M. Abdel-Mawgoud and G. Stephanopoulos, “Improving CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiency in *Yarrowia lipolytica* using direct tRNA-sgRNA fusions,” *Metab. Eng.*, vol. 62, pp. 106–115, 2020.
- [203] M. Liu *et al.*, “Methodologies for improving HDR efficiency,” *Front. Genet.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–9, 2019.
- [204] H. H. Y. Chang, N. R. Pannunzio, N. Adachi, and M. R. Lieber, “Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 8, pp. 495–506, 2017.
- [205] D. R. L. Jordan L. Doman<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Alexander A. Sousa<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Peyton B. Randolph<sup>1, 2, 3</sup>, Peter J. Chen<sup>1, 2, 3</sup>, “Designing and executing prime editing experiments in mammalian cells,” *Nat Protoc*, vol. 184, no. 22, pp. 5635-5652.e29, 2022.
- [206] A. G. Allen *et al.*, “A highly efficient transgene knock-in technology in clinically relevant cell types,” *Nat. Biotechnol.*, 2023.
- [207] M. Sachdeva *et al.*, “Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019.
- [208] B. R. Shy *et al.*, “High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 41, no. 4, pp. 521–531, 2023.
- [209] Y. U. Inoue *et al.*, “An optimized preparation method for long ssDNA donors to facilitate quick knock-in mouse generation,” *Cells*, vol. 10, no. 5, pp. 1–15, 2021.
- [210] D. J. Davis, J. F. McNew, H. Maresca-Fichter, K. Chen, B. P. Telugu, and E. C. Bryda, “Efficient DNA knock-in using AAV-mediated delivery with 2-cell embryo CRISPR-Cas9 electroporation,” *Front. Genome Ed.*, vol. 5, no. August, pp. 1–8, 2023.
- [211] R. M. Martin *et al.*, “Highly Efficient and Marker-free Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 Donor-Mediated Homologous Recombination,” *Cell Stem Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 821-828.e5, 2019.
- [212] N. T. Tran *et al.*, “CRISPR-Cas9-Mediated ELANE Mutation Correction in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells to Treat Severe Congenital Neutropenia,” *Mol. Ther.*, vol. 28, no. 12, pp. 2621–2634, 2020.
- [213] A. Gutierrez-Guerrero *et al.*, “Comparison of Zinc Finger Nucleases Versus CRISPR-Specific Nucleases for Genome Editing of the Wiskott-Aldrich Syndrome Locus,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 29, no. 3, pp. 366–380, 2018.
- [214] S. P. Thomas *et al.*, “A promoterless AAV6.2FF-based lung gene editing platform for the correction of surfactant protein B deficiency,” *Mol. Ther.*, vol. 31, no. 12, pp. 1–21, 2023.
- [215] P. D. Moço, O. Farnós, D. Sharon, and A. A. Kamen, “Targeted Delivery of Chimeric Antigen Receptor into T Cells via CRISPR-Mediated Homology-Directed Repair with a Dual-AAV6 Transduction System,” *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 45, no. 10, pp. 7705–7720, 2023.
- [216] L. Labanieh and C. L. Mackall, “CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation,” *Nature*, vol. 614, no. 7949, pp. 635–648, 2023.

- [217] A. V. Finck, T. Blanchard, C. P. Roselle, G. Golinelli, and C. H. June, "Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond," *Nat. Med.*, vol. 28, no. 4, pp. 678–689, 2022.
- [218] R. T. Mitsuyasu *et al.*, "Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 $\zeta$  gene-modified autologous CD4+ and CD8+ T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects," *Blood*, vol. 96, no. 3. pp. 785–793, 2000.
- [219] J. J. Melenhorst *et al.*, "Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells," *Nature*, vol. 602, no. 7897, pp. 503–509, 2022.
- [220] R. M. Young, N. W. Engel, U. Uslu, N. Wellhausen, and C. H. June, "Next-Generation CAR T-cell Therapies," *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 7, pp. 1625–1633, 2022.
- [221] M. Muthuveil, H. Srinivasan, L. Louis, and S. Martin, "Engineering off-the-shelf universal CAR T cells: A silver lining in the cloud," *Cytokine*, vol. 156, no. June, 2022.
- [222] A. Holzinger and H. Abken, "CAR T Cells: A Snapshot on the Growing Options to Design a CAR," *HemaSphere*, vol. 3, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [223] Charles L. Sentman<sup>1</sup> and Kenneth R. Meehan<sup>2</sup>, "NKG2D CARs as Cell Therapy for Cancer," *Cancer J*, vol. 4, no. 2, pp. 1–15, 2015.
- [224] S. M. El-Daly and J. Hussein, "Genetically engineered CAR T-immune cells for cancer therapy: Recent clinical developments, challenges, and future directions," *J. Appl. Biomed.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [225] N. P. S. Daniel E Shumer, Natalie J Nokoff and P. D. . Erin C. Dowd, M.D.a, Michael J. Frank, Ph.D.b, Anne Collins, Ph.D.c, James M. Goldd, and Deanna M. Barch, "Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 12, pp. 139–148, 2017.
- [226] C. Zhang, J. Liu, J. F. Zhong, and X. Zhang, "Engineering CAR-T cells," *Biomark. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 3–8, 2017.
- [227] G. López-Cantillo, C. Urueña, B. A. Camacho, and C. Ramírez-Segura, "CAR-T Cell Performance: How to Improve Their Persistence?," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. April, pp. 1–16, 2022.
- [228] D. C. A. R. Gomes-silva, "Cancer immunotherapy using CAR-T cells: from the research bench to the assembly line," pp. 1–20, 2017.
- [229] F. Blaeschke *et al.*, "Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4+ and CD8+ CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19+ acute lymphoblastic leukemia," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 67, no. 7, pp. 1053–1066, 2018.
- [230] M. Hiltensperger and A. M. Krackhardt, "Current and future concepts for the generation and application of genetically engineered CAR-T and TCR-T cells," *Front. Immunol.*, vol. 14, no. March, pp. 1–15, 2023.
- [231] S. Guedan, H. Calderon, A. D. Posey, and M. V. Maus, "Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 12, no. March, pp. 145–156, 2019.
- [232] H. Lin, J. Cheng, W. Mu, J. Zhou, and L. Zhu, "Advances in Universal CAR-T Cell Therapy," *Front. Immunol.*, vol. 12, no. October, pp. 1–12, 2021.
- [233] Y. Guo *et al.*, "CRISPR/Cas9 genome-edited universal CAR T cells in patients with relapsed/refractory lymphoma," *Blood Adv.*, vol. 6, no. 8, pp. 2695–2699, 2022.
- [234] R. C. Sterner and R. M. Sterner, "CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies," *Blood Cancer J.*, vol. 11, no. 4, 2021.
- [235] G. Roex *et al.*, "Safety and clinical efficacy of BCMA CAR-T-cell therapy in multiple myeloma," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, 2020.

- [236] R. Patel, M. Patel, F. Laxmidhar, K. Lakhatariya, D. Patel, and Z. Patel, "Cytokine Release Syndrome in Patients Treated With Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy : A Retrospective Study Analyzing Risks , Outcomes , and Healthcare Burden," vol. 15, no. 11, pp. 1–10, 2023.
- [237] Y. J. Chen, B. Abila, and Y. Mostafa Kamel, "CAR-T: What Is Next?," *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 3, 2023.
- [238] M. L. Schubert *et al.*, "Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy," *Ann. Oncol.*, vol. 32, no. 1, pp. 34–48, 2021.
- [239] K. L. Chohan, E. L. Siegler, and S. S. Kenderian, "CAR-T Cell Therapy: the Efficacy and Toxicity Balance," *Curr. Hematol. Malign. Rep.*, vol. 18, no. 2, pp. 9–18, 2023.
- [240] E. C. Morris, S. S. Neelapu, T. Giavridis, and M. Sadelain, "Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 22, no. 2, pp. 85–96, 2022.
- [241] N. G. Holtzman *et al.*, "Immune effector cell-Associated neurotoxicity syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for lymphoma: Predictive biomarkers and clinical outcomes," *Neuro. Oncol.*, vol. 23, no. 1, pp. 112–121, 2021.
- [242] A. D. Cohen *et al.*, "B cell maturation antigen–specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma," *J. Clin. Invest.*, vol. 129, no. 6, pp. 2210–2221, 2019.
- [243] C. E. Brown *et al.*, "Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 26, pp. 2561–2569, 2016.
- [244] S. Sun, H. Hao, G. Yang, Y. Zhang, and Y. Fu, "Immunotherapy with CAR-modified T cells: Toxicities and overcoming strategies," *J. Immunol. Res.*, vol. 2018, no. Figure 1, 2018.
- [245] H. Li and Y. Zhao, "Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy," *Protein Cell*, vol. 8, no. 8, pp. 573–589, 2017.
- [246] R. Chen *et al.*, "CAR-T treatment for cancer: prospects and challenges," *Front. Oncol.*, vol. 13, no. December, pp. 1–13, 2023.
- [247] M. Davoodzadeh Gholami, G. A. kardar, Y. Saeedi, S. Heydari, J. Garssen, and R. Falak, "Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms," *Cell. Immunol.*, vol. 322, pp. 1–14, 2017.
- [248] W. Zhang *et al.*, "Disruption of CTLA-4 expression on peripheral blood CD8 + T cell enhances anti-tumor efficacy in bladder cancer," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2019.
- [249] G. Lin, S. Chen, and P. Mi, "Nanoparticles Targeting and Remodeling Tumor Microenvironment for Cancer Theranostics," vol. 14, no. 7, pp. 1189–1207, 2018.
- [250] R. Grosser, L. Cherkassky, N. Chintala, and P. S. Adusumilli, "Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors," *Cancer Cell*, vol. 36, no. 5, pp. 471–482, 2019.
- [251] M. Legut, G. Dolton, A. A. Mian, O. G. Ottmann, and A. K. Sewell, "CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic t cells," *Blood*, vol. 131, no. 3, pp. 311–322, 2018.
- [252] C. C. Kloss *et al.*, "Dominant-Negative TGF- $\beta$  Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication," *Molecular Therapy*, vol. 26, no. 7. pp. 1855–1866, 2018.
- [253] Z. Ying *et al.*, "A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy," *Nat. Med.*, vol. 25, no. 6, pp. 947–953, 2019.
- [254] S. Stock *et al.*, "Mechanisms and strategies for safe chimeric antigen receptor T-cell activity control," *Int. J. Cancer*, vol. 153, no. 10, pp. 1706–1725, 2023.
- [255] M. Tristán-Manzano *et al.*, "Physiological lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells,"

*Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 25, no. June, pp. 335–349, 2022.

- [256] S. J. van der S. and M. S. Justijn Eyquem, Jorge Mansilla-Soto, Teodoros Giavridis, “Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017.
- [257] E. R. Hawkins, R. R. D’souza, and A. Klampatsa, “Armored CAR T-cells: The next chapter in T-cell cancer immunotherapy,” *Biol. Targets Ther.*, vol. 15, pp. 95–105, 2021.
- [258] M. Chmielewski, A. A. Hombach, and H. Abken, “Of CARs and TRUCKS: Chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma,” *Immunol. Rev.*, vol. 257, no. 1, pp. 83–90, 2014.
- [259] S. M. Tariq *et al.*, “Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: A Beacon of Hope in the Fight Against Cancer,” *Cureus*, vol. 10, no. 10, 2018.
- [260] L. Jin *et al.*, “CXCR1- or CXCR2-modified CAR T cells co-opt IL-8 for maximal antitumor efficacy in solid tumors,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2019.
- [261] L. Liu *et al.*, “Enhanced CAR-T activity against established tumors by polarizing human T cells to secrete interleukin-9,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020.
- [262] S. H. Van Der Burg, “IL11: A specific repressor of tumor-specific CD4+ T cells,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 9, no. 7, p. 724, 2021.
- [263] H. J. Pegram *et al.*, “IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia,” *Leukemia*, vol. 29, no. 2, pp. 415–422, 2015.
- [264] M. Zannikou *et al.*, “IL15 modification enables CAR T cells to act as a dual targeting agent against tumor cells and myeloid-derived suppressor cells in GBM,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 11, no. 2, 2023.
- [265] S. A. Batra *et al.*, “Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 309–320, 2020.
- [266] V. Hoyos *et al.*, “Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety,” *Leukemia*, vol. 24, no. 6, pp. 1160–1170, 2010.
- [267] D. Alizadeh *et al.*, “IL15 enhances CAR-T-cell antitumor activity by reducing mTORC1 activity and preserving their stem cell memory phenotype,” vol. 7, no. 5, pp. 759–772, 2020.
- [268] L. Giuffrida *et al.*, “IL-15 Preconditioning Augments CAR T Cell Responses to Checkpoint Blockade for Improved Treatment of Solid Tumors,” *Mol. Ther.*, vol. 28, no. 11, pp. 2379–2393, 2020.
- [269] H. C. Wong, E. K. Jeng, and P. R. Rhode, “The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8+ T cells into innate-like effector cells with antitumor activity,” *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 11, pp. 9–12, 2013.
- [270] S. G. R. B. S. A. N. R. Heller, “IL-15L-15R $\alpha$  Heterodimeric Complex as Cancer Immunotherapy in Murine Breast Cancer Models.pdf.” 2021.
- [271] A. Bessard, V. Solé, G. Bouchaud, A. Quémener, and Y. Jacques, “High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor  $\alpha$  fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 8, no. 9, pp. 2736–2745, 2009.
- [272] E. Lanitis *et al.*, “Optimized gene engineering of murine CAR-T cells reveals the beneficial effects of IL-15 coexpression,” *J. Exp. Med.*, vol. 218, no. 2, 2021.
- [273] S. Reardon, “‘Treasure trove’ of new CRISPR systems holds promise for genome editing,” *Nature*, vol. 624, no. 7990, pp. 17–18, 2023.

- [274] L. V. Hurton *et al.*, "Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 48, pp. E7788–E7797, 2016.
- [275] D. Sarhan *et al.*, "161533 TriKE stimulates NK-cell function to overcome myeloid-derived suppressor cells in MDS," *Blood Adv.*, vol. 2, no. 12, pp. 1459–1469, 2018.
- [276] G. Roex *et al.*, "Two for one: targeting BCMA and CD19 in B-cell malignancies with off-the-shelf dual-CAR NK-92 cells," *J. Transl. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–13, 2022.
- [277] K. H. Chen *et al.*, "A compound chimeric antigen receptor strategy for targeting multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 32, no. 2, pp. 402–412, 2018.
- [278] C. Roddie *et al.*, "Dual targeting of CD19 and CD22 with bicistronic CAR-T cells in patients with relapsed/refractory large B-cell lymphoma," *Blood*, vol. 141, no. 20, pp. 2470–2482, 2023.
- [279] E. Kokalaki *et al.*, "Dual targeting of CD19 and CD22 against B-ALL using a novel high-sensitivity aCD22 CAR," *Mol. Ther.*, vol. 31, no. 7, pp. 2089–2104, 2023.
- [280] and W. A. L. Chia-Yung Wu<sup>1, 2</sup>, Kole T. Roybal<sup>1, 2</sup>, Elias M. Puchner<sup>1,†</sup>, James Onuffer<sup>1, 2,\*</sup>, "Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor," *Science*, vol. 347, no. 6, pp. 742–768, 2015.
- [281] T. J. Fry *et al.*, "CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy," *Nat. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 20–28, 2018.
- [282] M. Hegde *et al.*, "Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Rα2 mitigate tumor antigen escape," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 8, pp. 3036–3052, 2016.
- [283] E. Zah, M. Y. Lin, S. B. Anne, M. C. Jensen, and Y. Y. Chen, "T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 4, no. 6, pp. 498–508, 2016.
- [284] M. Hamieh, J. Mansilla-Soto, I. Rivière, and M. Sadelain, "Programming CAR T Cell Tumor Recognition: Tuned Antigen Sensing and Logic Gating," *Cancer Discov.*, vol. 13, no. 4, pp. 829–843, 2023.
- [285] C. C. Kloss, M. Condomines, M. Cartellieri, M. Bachmann, and M. Sadelain, "Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells," *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, no. 1, pp. 71–75, 2013.
- [286] P. S. Rana, E. V. Murphy, J. Kort, and J. J. Driscoll, "Road testing new CAR design strategies in multiple myeloma," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. August, pp. 1–14, 2022.
- [287] K. T. Roybal *et al.*, "Precision Tumor Recognition by T Cells with Combinatorial Antigen-Sensing Circuits," *Cell*, vol. 164, no. 4, pp. 770–779, 2016.
- [288] J. H. Choe *et al.*, "SynNotch-CAR T cells overcome challenges of specificity, heterogeneity, and persistence in treating glioblastoma," *Sci. Transl. Med.*, vol. 13, no. 591, pp. 1–32, 2021.
- [289] and O. N. W. Nathanael J. Bangayana<sup>1</sup>, Liang Wangb, Giselle Burton Sojob, Miyako Noguchib, Donghui Chengb, Lisa Taa, Donny Gunnb, Zhiyuan Maoa, Shiqin Liua, Qingqing Yina, Mireille Riedingerb, Keyu Lia, Nathanael J. Bangayana<sup>1</sup>, Liang Wangb, Giselle Burton Sojob, Miya, "Dual-inhibitory domain iCARs improve the efficiency of the AND- NOT gate CAR T strategy," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 120, p. 2017, 2023.
- [290] M. Hashem Borojerd, F. Rahbarizadeh, P. Safarzadeh Kozani, E. Kamali, and P. Safarzadeh Kozani, "Strategies for having a more effective and less toxic CAR T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia," *Med. Oncol.*, vol. 37, no. 11, pp. 1–15, 2020.
- [291] B. DiAndreth, A. E. Hamburger, H. Xu, and A. Kamb, "The Tmod cellular logic gate as a solution for tumor-selective immunotherapy," *Clin. Immunol.*, vol. 241, no. May, p. 109030, 2022.
- [292] P. Celichowski *et al.*, "Tuning CARs: recent advances in modulating chimeric antigen receptor (CAR) T cell activity for improved safety, efficacy, and flexibility," *J. Transl. Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–23, 2023.

- [293] J. H. Cho, J. J. Collins, and W. W. Wong, "Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses," *Cell*, vol. 173, no. 6, pp. 1426-1438.e11, 2018.
- [294] J. Zhao, Q. Lin, Y. Song, and D. Liu, "Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 11, no. 1, pp. 25–29, 2018.
- [295] L. J. Rupp *et al.*, "CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-Tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [296] H. Pan *et al.*, "Allogeneic gene-edited HIV-specific CAR-T cells secreting PD-1 blocking scFv enhance specific cytotoxic activity against HIV Env+ cells in vivo," *Virol. Sin.*, vol. 38, no. 2, pp. 285–295, 2023.
- [297] C. Zhang, Y. Peng, P. Hublitz, H. Zhang, and T. Dong, "Genetic abrogation of immune checkpoints in antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte as a potential alternative to blockade immunotherapy," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2018.
- [298] Z. Zhao *et al.*, "CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes," *Oncotarget*, vol. 9, no. 4, pp. 5208–5215, 2018.
- [299] C. A. Chamberlain, E. P. Bennett, A. H. Kverneland, I. M. Svane, M. Donia, and Ö. Met, "Highly efficient PD-1-targeted CRISPR-Cas9 for tumor-infiltrating lymphocyte-based adoptive T cell therapy," *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 24, no. March, pp. 417–428, 2022.
- [300] L. Marotte *et al.*, "Increased antitumor efficacy of PD-1-deficient melanoma-specific human lymphocytes," *J. Immunother. Cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2020.
- [301] J. Ren *et al.*, "A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation," *Oncotarget*, vol. 8, no. 10, pp. 17002–17011, 2017.
- [302] K. Benabdellah, A. Gutierrez-Guerrero, M. Cobo, P. Muñoz, and F. Martín, "A chimeric HS4-SAR insulator (IS2) that prevents silencing and enhances expression of lentiviral vectors in pluripotent stem cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, 2014.
- [303] Takara Bio., "Guide-it Long ssDNA Production System v2 Protocol-at-a-Glance. Available online: [https://www.takarabio.com/documents/UserManual/Guide/Guide-itLongssDNAProductionSystemv2Protocol-at-a-Glance\\_071420.pdf](https://www.takarabio.com/documents/UserManual/Guide/Guide-itLongssDNAProductionSystemv2Protocol-at-a-Glance_071420.pdf) (accessed on 25 March 2021).," no. 071420, pp. 1–8, 2018.
- [304] K. E. Pauken *et al.*, "The PD-1 Pathway Regulates Development and Function of Memory CD8+ T Cells following Respiratory Viral Infection," vol. 31, no. 13, 2020.
- [305] S. Sánchez-Hernández *et al.*, "The IS2 Element Improves Transcription Efficiency of Integration-Deficient Lentiviral Vector Episomes," *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 13, no. December, pp. 16–28, 2018.
- [306] T. Yahata *et al.*, "Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression," *Cancer Sci.*, vol. 110, no. 4, pp. 1279–1292, 2019.
- [307] M. N. Tsutomu Nakazawa, Atsushi Natsume, Fumihiko Nishimura, Takayuki Morimoto, Ryosuke Matsuda, I. N. , Shuichi Yamada, T. W. and Yasushi Motoyama, Young-Soo Park, Takahiro Tsujimura, and H. Nakase, "Effect of CRISPR/Cas9-Mediated PD-1-Disrupted Primary Human Third-Generation CAR-T Cells Targeting EGFRVIII on In Vitro Human Glioblastoma Cell Growth," *Cells*, pp. 1–20, 2020.
- [308] Z. Wang *et al.*, "Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 18, no. 9, pp. 2188–2198, 2021.
- [309] J. Zhang *et al.*, "Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL," *Nature*, vol. 609, no. 7926, pp. 369–374, 2022.
- [310] P. M. Odorizzi, K. E. Pauken, M. A. Paley, A. Sharpe, and E. John Wherry, "Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 7, pp. 1125–1137, 2015.

- [311] R. S. Kalinin *et al.*, "Engineered Removal of PD-1 From the Surface of CD19 CAR-T Cells Results in Increased Activation and Diminished Survival," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, no. October, pp. 1–11, 2021.
- [312] B. D. Choi *et al.*, "CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma," *J. Immunother. Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [313] and E. L. Karolina Pilipow#1, Alessandra Roberto#2, Mario Roederer#3, Thomas A. Waldmann#4, Domenico Mavilio#2, 5, "IL-15 and T cell stemness in T cell-based cancer immunotherapy," *Cancer Res.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2017.
- [314] Y. Hu *et al.*, "Safety and efficacy of CRISPR-based non-viral PD1 locus specifically integrated anti-CD19 CAR-T cells in patients with relapsed or refractory Non-Hodgkin's lymphoma: a first-in-human phase I study," *eClinicalMedicine*, vol. 60, no. May, p. 102010, 2023.
- [315] J. C. Nolz and M. J. Richer, "Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15," *Mol. Immunol.*, vol. 117, no. November 2019, pp. 180–188, 2020.
- [316] S. Zhang, J. Zhao, X. Bai, M. Handley, and F. Shan, "Biological effects of IL-15 on immune cells and its potential for the treatment of cancer," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 91, no. November 2020, p. 107318, 2021.
- [317] Y. Guo, L. Luan, N. K. Patil, and E. R. Sherwood, "Immunobiology of the IL-15/IL-15R $\alpha$  complex as an antitumor and antiviral agent," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 38, pp. 10–21, 2017.
- [318] K. Chamoto *et al.*, "Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 5, pp. E761–E770, 2017.
- [319] R. Goswami and M. H. Kaplan, *STAT Transcription Factors in T Cell Control of Health and Disease*, 1st ed., vol. 331. Elsevier Inc., 2017.
- [320] Y. Wolf, A. C. Anderson, and V. K. Kuchroo, "TIM3 comes of age as an inhibitory receptor," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. March, 2020.
- [321] V. Aggarwal, C. J. Workman, and D. A. A. Vignali, "LAG-3 as the third checkpoint inhibitor," vol. 24, no. September, pp. 1415–1422, 2023.
- [322] N. Singh, J. Perazzelli, S. A. Grupp, and D. M. Barrett, "Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 320, pp. 1–10, 2016.
- [323] D. Alizadeh *et al.*, "IL15 enhances CAR-T cell antitumor activity by reducing mTORC1 activity and preserving their stem cell memory phenotype," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 7, no. 5, pp. 759–772, 2019.
- [324] and L. L. Thomas A. Stoklasek, Kimberly S. Schluns#2, "Combined IL-15/IL-15R $\alpha$  Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo," *J Immunol.*, vol. 5, no. 3, 2006.