



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de células CAR-T fisiológicas e
inducibles de 4^a generación con aplicación
en inmunoterapia antitumoral**

Pedro Luis Justicia Lirio

Directores de tesis:

Dr. Francisco Martín Molina

Dra. María Tristán Manzano

Granada, abril 2023



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



LentiStem
biotech.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Pedro Luis Justicia Lirio
ISBN: 978-84-1195-465-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/95852>

El doctorando / *The doctoral candidate* **Pedro Luis Justicia Lirio** y los directores de la tesis / *and the thesis supervisor/s*: **Dr. Francisco Martín Molina** y / *and* **Dra. María Tristán Manzano**.

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, 10 de abril de 2023

Directores de tesis
Thesis supervisors:

Doctorando
Doctoral candidate:

Francisco Martín
Molina

María Tristán
Manzano

Pedro Luis
Justicia Lirio

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, o una patente (en explotación, española concedida bajo examen previo o internacional), firmada por el doctorando, incluyendo parte de los resultados de la tesis doctoral:

- **Justicia-Lirio P**, Tristan-Manzano M, Maldonado-Perez N, Martin F (2022). Polinucleótido para expresión fisiológica en células T. WO/2022/058640 (patente internacional). Licenciada en exclusiva por LentiStem Biotech S.L. para su explotación comercial (**aval**).
- **Justicia-Lirio P***, Tristán-Manzano M*, Maldonado-Pérez N*, 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 the generation of inducible, transactivator-free Advanced Therapy Medicinal Products: application to CAR-T cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2023. doi: 10.1016/j.omtn.2023.03.018. *Shared first authorship (IF 10.183, Q1).

Artículos adicionales durante el periodo de tesis doctoral

- **Justicia-Lirio P***, Tristan-Manzano M*, Maldonado-Perez N, Cortijo-Gutierrez M, Benabdellah K. Martin F. Externally-Controlled Systems for Immunotherapy: From Bench to Bedside. *Front Immunol*. 2020. 11: 2044. doi:

10.3389/fimmu.2020.02044. PMID: 33013864. PMCID: PMC7498544. *Shared first authorship (IF 8.786, Q1).

- Pavlovic K, Tristan-Manzano M, Maldonado-Perez N, Cortijo-Gutierrez M, Sanchez-Hernandez S, **Justicia-Lirio P**, Carmona, C. Herrera MD, Martin F, Benabdellah K. Using Gene Editing Approaches to Fine-Tune the Immune System. *Front Immunol.* 2020. 11: 570672. doi: 10.3389/fimmu.2020.570672. PMID: 33117361; PMCID: PMC7553077 (IF 8.786, Q1).
- 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. *Molecular Therapy Oncolytics.* 2022. 25: 335-349. doi: 10.1016/j.omto.2022.05.003. PMID: 35694446; PMCID: PMC9163403 (IF 6.311, Q1).
- Maldonado-Perez N, Tristan-Manzano M, **Justicia-Lirio P**, Martinez-Planes E, Munoz P, Pavlovic K, Cortijo-Gutierrez M, Blanco-Benitez C, Castilla M, Juan M, Wenes M, Romero P, Molina-Estevez FJ, Maranon C, Herrera C, Benabdellah K, Martin F. Efficacy and safety of universal (TCRKO) ARI-0001 CAR-T cells for the treatment of B-cell lymphoma. *Front Immunol.* 2022. 13: 1011858. doi: 10.3389/fimmu.2022.1011858. PMID: 36275777; PMCID: PMC9585383 (IF 8.786, Q1).

Becas y financiación

El trabajo de investigación presentado en esta tesis ha sido realizado en LentiStem Biotech en colaboración con el grupo de Terapia Génica y Celular del Departamento de Medicina Genómica, en el Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO).

El candidato doctoral Pedro Luis Justicia Lirio agradece las fuentes de financiación que han hecho este proyecto posible: 1) Ayudas para la Formación de Doctores en Empresas "Doctorados Industriales" 2018, del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, referencia: DIN2018-010180 y 2) financiación privada de LentiStem Biotech S.L.

El trabajo presentado ha sido co-financiado por el Instituto de Salud Carlos III a través de los proyectos PI21/00298, PMPTA22/00060 y RD21/0017/0004 dentro del marco de la Red de Terapias Avanzadas (TerAv), por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto en líneas estratégicas PLEC2021-008094 y del proyecto EXP - 00123009 / SNEO-20191072 junto al CDTI, y por la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía a través de los proyectos EXP - CARTPI-0001-201, PECART-0031-2020 y CAR-T 2019 00400200101918 en el marco de la Red Andaluza de Terapias CAR (RANTECAR).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
1. Cáncer: tumores hematológicos y sólidos	15
1.1. Cáncer: una enfermedad heterogénea	15
1.1.1. Tratamientos convencionales contra el cáncer	15
1.2. Neoplasias hematológicas del linaje B.....	17
1.2.1. Leucemia linfoblástica aguda de células B (B-LLA).....	18
1.2.2. Leucemia linfocítica crónica de células B (B-LLC).....	19
1.2.3. Linfomas no – Hodgkin.....	20
1.2.4. Linfoma de Hodgkin	21
1.2.5. Mieloma múltiple.....	23
1.3. Tumores sólidos	24
1.3.1. Progresión y resistencia de tumores sólidos	25
1.3.2. Células madre cancerígenas	25
1.3.3. Microambiente tumoral.....	27
1.3.4. Cáncer de páncreas: una necesidad clínica no cubierta.....	31
2. Papel antitumoral del sistema inmunitario	35
2.1. Inmunoección del cáncer	36
2.2. Linfocito T y su papel antitumoral	39
2.2.1. Células T naïve.....	40
2.2.2. Células T troncales memoria.....	41
2.2.3. Células T memoria	41
2.2.4. Células T efectoras.....	42
2.3. Receptor de las células T	44
2.3.1. Estructura del complejo TCR:CD3	44
2.3.2. Señalización del TCR.....	45
2.3.3. Reciclaje y degradación del TCR	46
2.4. Mecanismos de disfunción de las células T	47
3. Inmunoterapia antitumoral	51
3.1. Terapia con citoquinas	51

3.2.	Inhibidores de puntos de control inmunológicos (ICIs)	52
3.3.	Vacunas	53
3.4.	Transferencia celular adoptiva	54
4.	Herramientas para la modificación genética de células T	57
4.1.	Adición génica.....	58
4.1.1.	Métodos virales de integración estable	58
4.1.2.	Métodos no virales de integración estable.....	61
4.1.3.	Métodos no virales de expresión transitoria	63
5.	Receptores de antígeno quiméricos.....	65
5.1.	Estructura y biología de los CARs	65
5.1.1.	Ectodominio.....	65
5.1.1.1.	Dominio de reconocimiento de antígeno	65
5.1.1.2.	Región bisagra	68
5.1.2.	Dominio transmembrana	69
5.1.3.	Endodominio.....	70
5.1.3.1.	Dominio coestimulador.....	70
5.1.3.2.	Dominio de activación.....	72
5.1.4.	Evolución de las células CAR-T	73
5.2.	Manufactura de las células CAR-T.....	75
6.	Terapia CAR-T para el tratamiento de neoplasias hematológicas.....	79
6.1.	Dianas para la terapia CAR-T frente a neoplasias hematológicas	79
6.2.	Productos CAR-T aprobados frente a neoplasias hematológicas	80
6.2.1.	Kymriah (Tisagenlecleucel)	80
6.2.2.	Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel)	81
6.2.3.	Tecartus (Brexucabtagene Autoleucel).....	81
6.2.4.	Breyanzi (Lisocabtagene Maraleucel)	82
6.2.5.	Abecma (Idecabtagene Vicleucel).....	83
6.2.6.	Carvykti (Ciltacabtagene Autoleucel).....	84
6.2.7.	Otros productos CAR-T	84
6.3.	Efectos secundarios asociados.....	90
6.3.1.	Síndrome de liberación de citoquinas	90

6.3.2.	Síndrome de neurotoxicidad asociado a células inmunoefectoras	91
6.3.3.	Aplasia de células B y citopenias	91
6.4.	Resistencia y recaída de la terapia CAR-T	92
7.	Terapia CAR-T para el tratamiento de tumores sólidos.....	95
7.1.	Dianas para la terapia CAR-T frente a tumores sólidos	95
7.2.	Ensayos clínicos de células CAR-T frente a tumores sólidos	96
7.3.	Limitaciones de la terapia CAR-T en el tratamiento de tumores sólidos	97
7.3.1.	Heterogeneidad intratumoral.....	98
7.3.2.	Tráfico e infiltración en el tejido tumoral	98
7.3.3.	Microambiente tumoral inmunosupresor	99
8.	Estrategias para la mejora de la eficacia y seguridad de las células CAR-T	103
8.1.	Regulación de la expresión del CAR	103
8.2.	Desarrollo de células TRUCK	106
8.2.1.	TRUCKs de expresión constitutiva	106
8.2.2.	TRUCKs de expresión inducible.....	113
8.3.	Sistemas inducibles controlados exógenamente: Lent-On-Plus como alternativa para la generación de TRUCKs inducibles.....	118
	HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	121
	OBJETIVOS	125
	MATERIALES Y MÉTODOS	129
1.	Cultivo celular	131
1.1.	Líneas celulares humanas.....	131
1.2.	Células T primarias	132
2.	Vectores lentivirales.....	133
2.1.	Vectores GFP constitutivos.....	133
2.2.	Vector Lent-On-Plus (GFP, LOPeGFP).....	133
2.3.	Vectores IL-18	133
2.4.	Vector EhCD19	135
2.5.	Vectores CAR	135
3.	Producción de vectores lentivirales	136
3.1.	Producción	136

3.2.	Titulación.....	136
4.	Modificación genética	137
4.1.	Transducción celular	137
4.2.	Edición genómica.....	138
5.	Estudios funcionales.....	139
5.1.	Cinéticas de expresión	139
5.2.	Estudio de proliferación.....	140
5.3.	Estudio de secreción de IL-18	140
5.4.	Estudio de activación celular	141
5.5.	Estudio de la polarización de macrófagos	141
5.6.	Estudio de citotoxicidad	142
6.	Citometría de flujo.....	143
7.	Extracción de ARN y PCR cuantitativa	147
8.	Preparación de doxiciclina	147
9.	Modelos animales y análisis de bioluminiscencia	148
9.1.	Modelos animales.....	148
9.2.	Análisis de bioluminiscencia.....	148
9.3.	Sacrificio de los animales	149
10.	Diseño de promotores quiméricos.....	149
11.	Análisis de sitios de unión de factores de transcripción.....	150
12.	Análisis de datos.....	150
	RESULTADOS.....	153
1.	Desarrollo de nuevos promotores para una expresión fisiológica ...	155
1.1.	Diseño y caracterización de los promotores.....	155
1.2.	Cinética de expresión de GFP bajo los promotores fisiológicos	160
1.3.	Expresión tejido – específica de GFP bajo los promotores	166
1.3.	quiméricos	166
2.	Mejora de la actividad antitumoral de las células CAR-T19 mediante la	
	expresión inducible de IL-18: células iTRUCK19.18	173
2.1.	Generación de células CAR-T secretoras de IL-18 de forma	
2.1.	inducible (iTRUCK19.18).....	173
2.2.	Caracterización de las células iTRUCK19.18	178

2.3.	Efecto de la inducción de IL-18 en la polarización de macrófagos	185
2.4.	Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en un modelo de linfoma de Burkitt en presencia de Dox	189
2.5.	Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en tumores B primarios en presencia de Dox.....	196
2.6.	Generación de un modelo de adenocarcinoma pancreático metastásico CD19+.....	199
2.7.	Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en un modelo de adenocarcinoma pancreático metastásico	203
3.	Generación de células empaquetadoras más eficientes para la producción de VLs.....	211
3.1.	Generación de células HEK-293T BAX-KO	212
3.2.	Generación y uso de células HEK-293T BAX/BAK-KO (DKO)....	215
	DISCUSIÓN	217
	CONCLUSIONES	233
	REFERENCIAS	237
	ANEXO I PUBLICACIÓN CIENTÍFICA	273

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de formación tumoral de las células madre cancerígenas.	27
Figura 2. Principales células presentes en el microambiente tumoral y variación fenotípica y funcional de las mismas.	31
Figura 3. Fases del proceso de inmunoección del cáncer: eliminación, equilibrio y escape.	38
Figura 4. Señalización del complejo del TCR tras el reconocimiento antigénico.	46
Figura 5. Estructura de un receptor de antígeno quimérico (CAR) y generaciones de CARs desarrolladas.	74
Figura 6. Estructura de los seis productos CAR aprobados por la FDA/EMA, y promotores que permiten su expresión.	87
Figura 7. Principales limitaciones de la terapia CAR-T en el tratamiento de tumores sólidos.	101
Figura 8. Principales citoquinas expresadas por las células CAR-T de 4ª generación y función que desempeñan.	117
Figura 9. Sistemas de expresión inducible endógenos y exógenos.	120
Figura 10. Estructura de los promotores quiméricos.	156
Figura 11. Análisis in silico de los promotores quiméricos.	159
Figura 12. Cinética de expresión de GFP bajo los promotores CD4, B2M, AW y CMV en células T primarias.	161
Figura 13. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 en células T primarias CD4+ y CD8+.	162
Figura 14. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 en células T primarias en diferentes subpoblaciones fenotípicas.	163
Figura 15. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M en células T primarias CD4+ y CD8+.	164
Figura 16. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M en células T primarias en diferentes subpoblaciones fenotípicas.	165
Figura 17. Cinética de expresión de GFP bajo los promotores CD4 y B2M en comparación con la expresión endógena de CD4 y B2M.	166
Figura 18. Expresión tejido-específica de GFP bajo el promotor CD4.	168
Figura 19. Expresión de GFP bajo el promotor B2M en distintos tipos celulares.	170
Figura 20. Intensidad de expresión de GFP bajo los promotores quiméricos.	171
Figura 21. Generación de células T primarias productoras de IL-18 constitutivamente o de forma inducible.	175
Figura 22. Generación de células CAR-T productoras de IL-18 de manera inducible (iTRUCK19.18).	177
Figura 23. Caracterización de las células iTRUCK19.18 tras su producción.	181
Figura 24. Caracterización fenotípica de las subpoblaciones de las células ARI e iTRUCK19.18 con y sin dox en estado basal y tras activación.	182

Figura 25. Caracterización de marcadores de activación de células ARI e iTRUCK19.18 en presencia y ausencia de dox.....	184
Figura 26. Expresión de los receptores inhibitorios de células ARI e iTRUCK19.18 en estado basal y tras activación.	185
Figura 27. La adición de doxiciclina a las iTRUCK19.18 produce la polarización de macrófagos primarios humanos hacia un fenotipo M1.....	186
Figura 28. Efecto de la adición de dox sobre las células iTRUCK19.18 en co-cultivo con macrófagos.....	188
Figura 29. Estudio de la citotoxicidad de las células iTRUCK19.18 frente a células tumorales Namalwa <i>in vitro</i>	190
Figura 30. Expresión de IL-18 a través del sistema LOP en células iTRUCK19.18 sin y con doxiciclina <i>in vivo</i> y estudio de la eficacia antitumoral.	193
Figura 31. Eficacia antitumoral y caracterización de las células iTRUCK19.18 <i>in vivo</i>	195
Figura 32. Estudio de la citotoxicidad de las células iTRUCK19.18 de donantes sanos frente a tumores B primarios.	197
Figura 33. Estudio de la capacidad citotóxica de células iTRUCK19.18 generadas a partir de células T de paciente frente a su propio tumor primario.	198
Figura 34. Generación de un modelo celular de adenocarcinoma pancreático sobreexpresando CD19.....	200
Figura 35. Generación de un modelo ortotópico de tumor pancreático CD19+.	202
Figura 36. Estudio comparativo de la capacidad citotóxica de las células iTRUCK19.18 con y sin dox frente a células MIA PaCa2.....	204
Figura 37. Estudio de la eficacia de las células iTRUCK19.18 en un modelo ortotópico de tumor sólido <i>in vivo</i>	206
Figura 38. Caracterización de las células T infiltradas en el tumor y en diversos órganos extratumorales.	209
Figura 39. Estudio de la eficacia de las células iTRUCKAW19.18 en un modelo ortotópico de tumor sólido <i>in vivo</i>	210
Figura 40. Generación de células HEK-293T BAX-KO y comparativa de producción viral.	214
Figura 41. Generación de células HEK-293T BAX/BAK-KO, comparativa de producción viral y apoptosis.	216

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores asociados a las diferentes subpoblaciones de células T.	40
Tabla 2. Información relativa a los productos CART aprobados por la FDA/EMA.....	88
Tabla 3. Ensayos clínicos de células CAR-T dirigidas a los principales antígenos de tumores sólidos.....	102
Tabla 4. Lista de oligonucleótidos utilizados.	151

RESUMEN

RESUMEN

La terapia con células T que expresan Receptores de Antígeno Quiméricos (CARs) ha demostrado resultados sin precedentes en el tratamiento de neoplasias hematológicas del linaje B refractarias o en recaída. Sin embargo, a pesar de su alta eficacia antitumoral, esta terapia no está exenta de efectos secundarios graves como la tormenta de citoquinas o la neurotoxicidad. Además, la falta de potencia y/o persistencia de las células CAR-T debido a una sobreexpresión del CAR y a la interacción con un fuerte microambiente tumoral inmunosupresor, conduce a recaídas frecuentes en el tratamiento de tumores líquidos y a una falta de eficacia en el tratamiento de tumores sólidos. Además, el proceso de manufactura de las células CAR-T presenta limitaciones que, sumadas a los efectos secundarios, indican la necesidad de mejorar la terapia CAR-T. En esta tesis doctoral, hemos trabajado en tres objetivos para superar estas limitaciones:

Regulación endógena de la expresión génica. Eyquem y colaboradores demostraron (utilizando herramientas de edición genómica) que cuando un CAR α CD19 sigue una cinética similar a la del TCR tras el encuentro antigénico (internalización rápida tras la activación, y una posterior recuperación de niveles basales de expresión), las células CAR-T incrementaban su potencia antitumoral, mejorando las características del producto. Con el objetivo de llevar esto a cabo en un contexto de vectores lentivirales, nuestro grupo diseñó el promotor AW, un promotor sintético que permitió que el CAR siguiera una cinética TCR-like, lo que dotó a las células de características mejoradas. Sin embargo, debido a los bajos niveles de expresión del CAR obtenidos, en esta tesis diseñamos dos promotores sintéticos basados en B2M y CD4 con el objetivo de conseguir esta cinética, pero con mayores niveles de

expresión. Comprobamos que el promotor B2M presentó una cinética similar a la del TCR con un gen reportero y una mayor intensidad de expresión, lo que lo convierte en un buen candidato para la expresión de CARs. Por otro lado, el promotor CD4 no presentó una cinética TCR-like, aunque observamos una expresión restringida a tejidos asociada a este promotor, lo que lo hace interesante para aplicaciones que requieran expresar genes de manera restringida a células CD4.

Generación de TRUCKs inducibles para incrementar la potencia sin comprometer la seguridad. Con el objetivo de incrementar la potencia antitumoral de las células CAR-T, sin comprometer la seguridad de la terapia, utilizamos el sistema Lent-On-Plus (el único sistema de expresión inducible por doxiciplina libre de transactivadores) para controlar la expresión de IL-18 en células CAR-T antiCD19 (iTRUCK19.18). Generamos las células iTRUCK19.18, observando que la inducción de IL-18 permitió controlar la liberación de citoquinas proinflamatorias, así como el nivel de activación de las células T. Comprobamos, además, que las células iTRUCK19.18 controlaron la polarización de macrófagos primarios pro-tumorales (M2) hacia un fenotipo antitumoral (M1) de manera dependiente de doxiciplina. Esto se tradujo en un incremento de la actividad antitumoral de las células CAR-T, tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo tumoral líquido y otro sólido de elevada agresividad: un modelo de linfoma de Burkitt y un modelo de adenocarcinoma pancreático. Finalmente, generamos células iTRUCK19.18 a partir de células T de paciente, y observamos que la liberación de IL-18 incrementó la eliminación de tumores primarios B. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, las células iTRUCK19.18 son las primeras células CAR-T capaces de controlar la producción de IL-18 de manera exógena, y pueden suponer una

alternativa a la aplicación de células CAR-T convencionales en pacientes con ciertas neoplasias malignas agresivas.

Generación de células empaquetadoras de vectores lentivirales más eficientes. Con el objetivo obtener vectores lentivirales con un mayor título, algo fundamental en la manufactura de células CAR-T, generamos células empaquetadoras más resistentes a la apoptosis celular (la cual está asociada a la sobreexpresión de proteínas tóxicas, como el CAR). Para ello, utilizamos CRISPR-Cas9 para eliminar la expresión de los genes BAX y BAK, cruciales en el control de la apoptosis mitocondrial, en células HEK-293T, obteniendo células empaquetadoras más resistentes a la apoptosis, lo que derivó en un incremento de los títulos virales de dos CARs diferentes. Estas células representan una plataforma interesante para la producción de vectores o proteínas tóxicas y pueden mejorar la eficacia de la manufactura de las células CAR-T.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAV	vector adenoasociado, del inglés <i>adenoassociated vector</i>
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AICD	muerte inducida por activación, del inglés <i>activation-induced cell death</i>
allo-HSCT	trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, del inglés <i>allogeneic hematopoietic stem cells transplantation</i>
APD	adenocarcinoma pancreático ductal
BCMA	antígeno de maduración de las células B, del inglés <i>B cell maturation antigen</i>
BCR	receptor de células B, del inglés <i>B-cell receptor</i>
BITEs	del inglés <i>bi-specific T-cell engagers</i>
CAFs	fibroblastos asociados a cancer, del inglés <i>cancer-associated fibroblasts</i>
CAR	receptor de antígeno quimérico, del inglés <i>chimeric antigen receptor</i>
CR	remisión completa, del inglés <i>complete remission</i>
CRISPR	del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRS	síndrome de liberación de citoquinas, del inglés <i>cytokine release syndrome</i>
CSCs	células madre cancerígenas, del inglés <i>cancer stem cells</i>
CTV	del inglés <i>Cell Trace Violet</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DLBCL	linfoma difuso de células B grandes, del inglés <i>diffuse large B cell lymphoma</i>
Dox	doxiciclina
EF1α	factor de elongación 1 α, del inglés <i>elongation factor 1 α</i>
eGFP	proteína verde fluorescente mejorada, del inglés <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EH	exención hospitalaria
EICH	enfermedad de injerto contra huésped
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GOI	gen de interés, del inglés <i>gene of interest</i>
HL	linfoma de Hodgkin, del inglés <i>Hodgkin Lymphoma</i>
HLA	antígeno leucocitario humano, del inglés <i>human leukocyte antigen</i>
HRS	células Hodgkin y Reed–Sternberg
HSCs	células progenitoras hematopoyéticas, del inglés <i>hematopoietic stem cells</i>
iC9	caspasa 9 inducible, del inglés <i>inducible caspase 9</i>

ICANS	síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunoefectoras, del inglés <i>immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>
iCARs	CARs inhibitorios, del inglés <i>inhibitory CARs</i>
ICIs	inhibidores de puntos de control inmunológicos
IFNγ	interferón gamma
IL-18BP	proteína de unión a IL-18, del inglés <i>IL-18 binding protein</i>
ITAM	motivos de activación basados en tirosinas inmunoceptoras, del inglés <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
LLA	leucemia linfoblástica aguda
LLC	leucemia linfocítica crónica
LOP	Lent-On-Plus
LTRs	repeticiones terminales largas, del inglés <i>long terminal repeats</i>
LZM	linfoma de zona marginal
MASTER	del inglés <i>Multifunctional Alginate Scaffold for T Cell Engineering and Release</i>
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos, del inglés <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MDSCs	células supresoras derivadas de células mieloides, del inglés <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>major histocompatibility complex</i>
MM	mieloma múltiple
MOI	multiplicidad de infección, del inglés <i>multiplicity of infection</i>
MoML	virus de la leucemia murina de Moloney
NFAT	del inglés <i>nuclear factor of activated T cell</i>
NHL	linfoma no – Hodgkin, del inglés <i>non – Hodgkin lymphoma</i>
NTD	no transducida, del inglés <i>non-transduced</i>
ORR	tasa de respuesta general, del inglés <i>Overall Response Rate</i>
PB	PiggyBac
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>
PD-L1	ligando 1 de muerte programada, del inglés <i>programmed death-ligand 1</i>
PMA	del inglés <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PTKs	proteínas tirosín quinasa
R/R	refractario o en recaída
RI	receptores inhibitorios
RNPs	ribonucleoproteínas
SB	Sleeping Beauty
scFv	fragmento variable de cadena sencilla, del inglés <i>single-chain variable fragment</i>
SEM	error estándar de la media, del inglés <i>standard error of the mean</i>
TAA	antígenos asociados a tumor, del inglés <i>tumor associated antigens</i>

TALENs	del inglés <i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TAM	macrófagos asociados a tumor, del inglés <i>tumor associated macrophages</i>
TanCAR	tándem CARs
T_{CM}	células T central memoria, del inglés <i>central memory T cells</i>
Tconv	células T convencionales
TCR	receptor de células T, del inglés <i>T-cells receptor</i>
T_{EF}	células T efectoras, del inglés <i>effector T cells</i>
tEGFR	factor de crecimiento epidérmico truncado, del inglés <i>truncated epidermal growth factor receptor</i>
T_{EM}	células T efectoras memoria, del inglés <i>effector memory T cells</i>
T_{EX}	células T agotadas, del inglés <i>exhausted T cells</i>
TFBS	sitio de unión de factores de transcripción, del inglés <i>transcription factor binding site</i>
TILs	linfocitos infiltrantes tumorales, del inglés <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>
TME	microambiente tumoral, del inglés <i>tumor microenvironment</i>
TRAC	del inglés <i>T-cell receptor alpha chain</i>
Tregs	células T reguladoras
TRUCKs	del inglés <i>T-cells redirected for unrestricted cytokine-initiated killing</i>
T_{SCM}	células T troncales memoria, del inglés <i>stem memory T cells</i>
VHH	dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VLs	vectores lentivirales
ZFNs	nucleasas de dedos de zinc, del inglés <i>Zinc-Finger Nucleases</i>
γRVs	vectores gamma retrovirales

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer: tumores hematológicos y sólidos

1.1. Cáncer: una enfermedad heterogénea

El término **cáncer** designa de manera genérica un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por tumores malignos; proliferaciones descontroladas de células que pueden afectar la función de diversos órganos y llegar a propagarse a regiones adyacentes, en un proceso llamado **metástasis**. A día de la escritura de esta tesis, el cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, OMS 2022).

Clásicamente, las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer han sido generalistas y reduccionistas. La intensa investigación durante las últimas décadas en sus bases moleculares ha dilucidado que el cáncer es una enfermedad compleja, multifactorial y diferente entre pacientes, por lo que se requieren aproximaciones basadas en la medicina personalizada para un tratamiento eficaz y seguro.

1.1.1. Tratamientos convencionales contra el cáncer

A día de hoy, por su amplio uso y eficacia, se considera a la quimioterapia, la radioterapia, la cirugía y la inmunoterapia como los 4 pilares en el tratamiento contra el cáncer. La **quimioterapia** no presenta actividad específica antitumoral, pues además de inhibir la proliferación descontrolada de las células tumorales, también afecta a numerosas células normales con altas tasas de proliferación, como células de los folículos pilosos, células epiteliales del tracto digestivo o células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, generando efectos secundarios severos en el paciente (Behranvand et al., 2022).

La terapia de radiación o **radioterapia** se basa en la eliminación o reducción del crecimiento tumoral mediante la aplicación de radiación

de alta energía, como rayos X, rayos gamma, electrones, protones, neutrones o iones de carbono (Lu et al., 2022). Aproximadamente, el 50% de los pacientes con cualquier tipo de cáncer reciben radioterapia, y el 40% de ellos responden en mayor o menor medida (Herrera et al., 2017). Sin embargo, la radioterapia también conlleva numerosos efectos secundarios como inflamación, problemas de coagulación o fibrosis. Además, existe entre un 0,2% a un 1% de probabilidad de inducción de neoplasias secundarias por acción de la radiación en supervivientes de cáncer tratados con radioterapia a los 3 años (Hoskin, 2002).

La **resección quirúrgica** es el método de tratamiento del cáncer más antiguo, pero incluso a día de hoy sigue siendo de manera incuestionable el método más eficaz. Sin embargo, el rango de aplicación de la cirugía es reducido, ya que la posibilidad de resección quirúrgica es nula o muy baja en muchos tipos de cáncer, especialmente en cánceres hematológicos. Otro ejemplo es el cáncer de páncreas, donde solo el 10% de los pacientes entran en los criterios de la cirugía de resección convencional (Strobel et al., 2019). Además, de los pacientes intervenidos, más del 90% recaen y acaban muriendo en menos de 26 meses (Neoptolemos et al., 2018).

La **inmunoterapia** ha cambiado el paradigma de los tratamientos convencionales contra el cáncer ya que, a diferencia del resto de tratamientos, es la única terapia biológica. La inmunoterapia abarca un conjunto de formas de tratamiento destinadas a modificar el sistema inmunológico del propio paciente con el objetivo de eliminar el tumor. Esto se puede alcanzar de diversas maneras, entre las que encontramos la terapia con anticuerpos monoclonales, la transferencia celular adoptiva o los virus oncolíticos, entre otros (se detalla en apartados posteriores) (Khan et al., 2021). La aplicación como

monoterapia o mediante uso combinado de esta terapia dirigida ha dado resultados especialmente relevantes en indicaciones con tasas de supervivencia tradicionalmente bajas, como el melanoma metastásico o algunos tipos de linfomas agresivos (Hoteit et al., 2021). Sin embargo, la inmunoterapia no está exenta de efectos secundarios, consecuencia de que la modulación del sistema inmunitario puede generar de manera colateral procesos de autoinmunidad e inflamación no específica (Riley et al., 2019).

De manera general, encontramos dos categorías principales de cáncer, los cánceres hematológicos (o neoplasias hematológicas) y los tumores sólidos. Dentro de los cánceres hematológicos, en esta introducción nos centraremos en las neoplasias del linaje B, y dentro de los tumores sólidos, nos centraremos en explicar los mecanismos subyacentes a las resistencias a los diferentes tratamientos, con especial énfasis en el cáncer de páncreas.

1.2. Neoplasias hematológicas del linaje B

Las neoplasias hematológicas constituyen el 4º tipo más frecuente de cánceres diagnosticados a nivel mundial. Forman un grupo de enfermedades caracterizadas por la expansión clonal de células hematopoyéticas en distintos estados de diferenciación. Existen distintas clasificaciones de los cánceres hematológicos, pero a nivel general, estos incluyen las leucemias (donde el origen del crecimiento celular descontrolado surge en la sangre y/o médula ósea), los linfomas (donde la proliferación se inicia en los ganglios linfáticos) y el mieloma múltiple (donde la proliferación surge en las células plasmáticas de la médula ósea) (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, SEHH). En 2020, se diagnosticaron a nivel mundial 474.519 personas con algún tipo de leucemia, y fallecieron 311.594. En cuanto a linfomas

(sumando linfomas Hodgkin y no-Hodgkin), se diagnosticaron 627.439 casos, y fallecieron 283.169. Finalmente, en el caso de mieloma múltiple, se diagnosticaron 176.404 casos, y fallecieron 117.077 personas (GLOBOCAN 2020).

Según la OMS, dentro de los síndromes proliferativos, se distinguen los que afectan al linaje celular B, y los que afectan a los linajes T y NK. Los síndromes más frecuentes son los que afectan las células B en distintos estados de diferenciación, conocidos como neoplasias hematológicas del linaje B. Dentro de los síndromes linfoproliferativos B más frecuentes, encontramos:

- Leucemia linfoblástica aguda de células B.
- Leucemia linfocítica crónica.
- Linfomas No-Hodgkin.
- Linfoma de Hodgkin.
- Mieloma múltiple.

1.2.1. Leucemia linfoblástica aguda de células B (B-LLA)

La leucemia linfoblástica aguda de células B es una transformación maligna donde proliferan de manera descontrolada poblaciones clonales de progenitores linfoides B inmaduros en la médula ósea, sangre y sitios extramedulares. Mientras que el 80% de las B-LLA ocurren en población infantil, el desarrollo en la población adulta suele tener un pronóstico considerablemente más pesimista. Aunque diversos estudios en población pediátrica han mostrado que la presencia de ciertos síndromes (síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom o ataxia telangiectasia) puede predisponer al desarrollo de B-LLA, el porcentaje es minoritario ya que, en la mayoría de ocasiones, la enfermedad aparece como consecuencia de mutaciones *de novo* en población sana (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

B-LLA representa el cáncer infantil más común, y la segunda leucemia aguda más frecuente en la población adulta. La incidencia a nivel mundial es de 4.75 por cada 100.000 personas (National Cancer Institute, 2022). La supervivencia media en 5 años es del 90% en población infantil (con una tasa de recaída del 15 – 20%), pero del 30% en la población adulta (con una tasa de recaída del 60 – 70%) (Leukaemia Care, 2021).

Actualmente, la primera línea de tratamiento para pacientes pediátricos o adultos con B-LLA es quimioterapia administrada en tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento, aunque puede variar entre pacientes. Para pacientes en recaída/refractarios (R/R) a la primera línea de tratamiento se considera un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (allo-HSCT, del inglés *allogeneic hematopoietic stem cells transplantation*), y tras la segunda recaída se considera algunos tipos de inmunoterapia, como el uso del anticuerpo monoclonal blinatumomab, con resultados muy destacables en pacientes sin más opciones terapéuticas o, recientemente, la terapia CAR-T αCD19 (American Cancer Society, 2019).

1.2.2. Leucemia linfocítica crónica de células B (B-LLC)

La leucemia linfocítica crónica se caracteriza por la proliferación clonal y acumulación de células B maduras (típicamente CD5+) en la sangre, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo (Hallek et al., 2018). En la LLC, los eventos leucomogénicos primarios parecen ocurrir ya en las células troncales hematopoyéticas, por la pérdida o adición de grandes regiones cromosómicas (deleción 13q, deleción 11q y trisomía 12), que pueden estar seguidos por mutaciones posteriores que incrementan la agresividad (Landau et al., 2015).

La incidencia de la LLC es de 4.9 por cada 100.000 habitantes, siendo uno de los tipos de leucemia más frecuentes. Mientras que la incidencia ha permanecido estable durante las últimas dos décadas, la supervivencia en 5 años ha aumentado considerablemente (65.1% en 1975 hasta 87.2% en 2021).

El tratamiento de primera línea para pacientes con LLC es quimioterapia con agentes citostáticos (análogos de purina o bendamustina, dependiendo de la velocidad de progresión). Sin embargo, la LLC presenta una característica particular, y es que la supervivencia de las células transformadas depende en gran medida de la permisividad del microambiente, dictada por los estímulos de macrófagos, células T o células dendríticas foliculares estromales, que aportan señales cruciales para la supervivencia y actividad pro – proliferativa de las células tumorales. Por ello, las recaídas son frecuentes, y en pacientes R/R, las opciones son: anticuerpos monoclonales, inhibidores de BTK o PI3K, allo-HSCT o terapia CAR-T (Hallek & Al-Sawaf, 2021).

1.2.3. Linfomas no – Hodgkin

Los linfomas se generan en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios y ganglios linfáticos, una estructura dinámica donde ocurre el encuentro de las células B *naïve* con el antígeno.

Los linfomas no – Hodgkin (NHL, del inglés *non – Hodgkin lymphomas*) representan un espectro de neoplasias que varía desde las más indolentes hasta las más agresivas. Estos tipos de neoplasias constituyen un paradigma en los cánceres basados en traslocaciones ya que, de manera simplificada, la proliferación descontrolada se origina consecuencia de una estimulación antigénica crónica, que fuerza a las células B a una intensa proliferación y un reordenamiento continuo de los genes relacionados con las inmunoglobulinas para la

selección de células B secretoras de anticuerpos de alta afinidad, lo que incrementa la probabilidad de errores genéticos aleatorios. Situaciones de inmunosupresión prolongadas favorecen la aparición de este tipo de linfomas. De hecho, diversas infecciones virales y bacterianas se han asociado con el desarrollo de NHL (Singh et al., 2020).

Este conjunto de linfomas son uno de los tipos más comunes a nivel mundial, suponiendo el 90% de todos los linfomas y el 4% de todos los cánceres. Anualmente se detectan aproximadamente medio millón de nuevos casos, y mueren más de 250.000 pacientes (GLOBOCAN, 2020). La supervivencia en 5 años es del 73.8%, siendo el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, del inglés *diffuse large B cell lymphoma*) el subtipo más frecuente (30% de los NHL), seguido del linfoma folicular (20%) (National Cancer Institute, 2022). Cabe destacar también un subtipo muy agresivo, el linfoma de Burkitt, que es la neoplasia humana de proliferación más rápida conocida hasta la fecha (Armitage et al., 2017).

Para el DLBCL (la indicación más frecuente), la primera línea de tratamiento pasa por un régimen de quimioterapia múltiple (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) junto con rituximab. Para pacientes R/R, se considera un allo-HSCT, aunque suele ser ineficiente en pacientes no respondedores a quimioterapia (American Cancer Society, 2022). A día de hoy, la terapia CAR-T αCD19 se ha postulado como primera línea de tratamiento en pacientes R/R (Sawalha & Maddocks, 2022).

1.2.4. Linfoma de Hodgkin

El linfoma de Hodgkin (HL, del inglés *Hodgkin Lymphoma*) es un linfoma de células B originado en el centro germinal, caracterizado por la presencia de células Hodgkin y Reed–Sternberg (CD30+) (HRS). Este

tipo celular porta reordenamientos en los genes codificantes para las inmunoglobulinas, dando lugar a células B carentes de receptor de células B (BCR, del inglés *B-cell receptor*). En células sanas, este proceso detonaría la apoptosis celular, pero en pacientes con HL, estas células son rescatadas de la apoptosis consecuencia de diversos eventos oncogénicos adicionales (Momotow et al., 2021). De hecho, algunos de los mecanismos de resistencia de este tipo celular incluyen una expresión reducida del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase I o II en su superficie celular, por mutaciones de pérdida de función o por translocaciones, lo que impide la presentación antigénica. Además, las células HRS portan con frecuencia un mayor número de copias de dos genes, PD-L1 (ligando 1 de muerte programada, del inglés *programmed death-ligand 1*) y 2. A día de hoy, parece claro que la interacción entre PD-L1/2 con PD1 constituye uno de los mecanismos de agotamiento prematuro de las células T, por lo que grandes esfuerzos están enfocados en la supresión de puntos de control inmunitario mediante el bloqueo de la interacción PD1/PD-L1 como potencial terapia. Cabe destacar también que este tipo celular suele presentar una expresión aberrante de MICA, lo que contribuye a la inhibición de la respuesta antitumoral mediada por células NK (Kessler et al., 2011).

HL presenta una incidencia de 3 personas por cada 100.000 (Storm et al., 2010). La supervivencia en 5 años es del 88% (American Cancer Society, 2022), aunque existe una gran variación en pacientes con HL, debido al rol fundamental de las alteraciones genéticas en esta enfermedad, hecho que se confirma por el riesgo significativamente incrementado en gemelos idénticos. Además, el 45% de casos son Epstein – Barr positivos, y pese a que una infección pasada parece ser un mecanismo potencialmente detonador en algunos pacientes, parece

claro que no es suficiente para el desarrollo de HL de manera independiente (Pallesen et al., 1991).

En cuanto al tratamiento de primera línea, depende del estado en el que se detecte la enfermedad, se aplica una combinación de agentes quimioterápicos junto a radioterapia localizada, o como monoterapia. En el caso de pacientes R/R, se aplica quimioterapia intensiva de rescate seguida de un auto-HSCT, donde la tasa de curación se sitúa en torno al 50%. En situaciones de segunda recaída, las opciones disponibles se basan generalmente en el uso de anticuerpos monoclonales anti-PD1 (Momotow et al., 2021).

1.2.5. Mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una gammapatía monoclonal que surge como consecuencia de una proliferación clonal descontrolada de células B plasmáticas. En individuos sanos, ante una exposición antigénica, las células B *naïve* proliferan y se produce la hipermutación somática de las secuencias *VDJ* de IgH e IgL. Este proceso produce células plasmáticas de larga duración (productoras de anticuerpos) residentes en médula ósea, que son un componente imprescindible de la inmunidad humoral. El desarrollo anormal de poblaciones clonales de células plasmáticas deriva en una producción excesiva de inmunoglobulinas, que puede causar múltiples efectos sistémicos. Más allá de esto, el mecanismo subyacente que origina el MM sigue siendo desconocido (Cowan et al., 2022).

Anualmente se diagnostican más de 150.000 casos de MM a nivel mundial, y fallecen en torno a 100.000 personas (GLOBOCAN, 2020). La supervivencia en 5 años es del 56% (American Cancer Society, 2022).

El tratamiento primario para pacientes con MM se basa en una combinación de moléculas inmunomoduladoras, inhibidores del proteosoma y esteroides. Además, se debe de considerar la posibilidad de un auto-HSCT. Para pacientes con MM R/R, la principal alternativa es la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD38 junto a la combinación de primera línea. Además, recientemente han surgido dos alternativas con resultados impresionantes en fases clínicas: belantamab mafodotin, un anticuerpo monoclonal dirigido hacia el antígeno de maduración de las células B (BCMA, del inglés *B-cell maturation antigen*), y la terapia CAR-T αBCMA, habiéndose aprobado diversos productos para pacientes con MM R/R por la FDA entre 2020 y 2022 (Cowan et al., 2022). De hecho, tradicionalmente, el MM se ha considerado una enfermedad incurable, y parece ser la terapia CAR-T la que dirige la patología hacia una curación completa, consiguiendo mantener un residuo mínimo en situaciones de refractariedad o multi-recaída (Mateos et al., 2022).

1.3. Tumores sólidos

Los tumores sólidos constituyen más del 95% de los casos de cáncer, y se originan como una masa anormal de tejido que suelen carecer de regiones líquidas, pudiendo ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos) (National Cancer Institute). Este tipo de tumores se pueden clasificar en base a la localización del tumor primario, o en base al tejido donde se origina. Siguiendo este segundo criterio de clasificación, encontramos carcinomas, sarcomas y tumores mixtos.

El **carcinoma** es una neoplasia maligna cuyo origen se produce en el tejido epitelial. Es el tipo de cáncer mayoritario debido a que el tejido epitelial está presente en la piel, así como en el recubrimiento externo e interno de órganos, representando entre el 80 – 90% de todos los

cánceres. Los carcinomas se dividen en dos subtipos principales: 1) adenocarcinomas, que se desarrollan en las estructuras glandulares de los órganos, y 2) carcinomas de células escamosas, que se originan en el epitelio escamoso (National Cancer Institute).

Por otro lado, el **sarcoma** es un tipo de neoplasia de origen celular mesenquimal que comienza en el hueso o en diversos tejidos blandos del organismo, como cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, tejido fibroso o conectivo, entre otros. De esta manera, se clasifica en dos subtipos: sarcoma óseo y sarcoma de tejidos blandos (Dufresne et al., 2018).

1.3.1. Progresión y resistencia de tumores sólidos

La mayoría de tumores se originan y progresan bajo una fuerte presión evolutiva, consecuencia de diversos factores tróficos, metabólicos, inmunológicos e incluso terapéuticos. El impacto relativo de estos factores en la evolución tumoral cambia con el espacio y el tiempo, favoreciendo el establecimiento de un microambiente neoplásico con una elevada heterogeneidad genética, fenotípica y comportamental (Vitale et al., 2021). La progresión, debido al proceso de inmunoedición del cáncer (se detallará en apartados posteriores), puede ser favorecida paradójicamente por acción del sistema inmunológico (O'Donnell et al., 2019).

1.3.2. Células madre cancerígenas

Uno de los aspectos críticos que ocurren en la transición entre un tumor benigno y uno maligno es la adquisición progresiva de estados de indiferenciación. Hay evidencias de que estas señales están estrechamente ligadas con la iniciación, propagación y resistencia tumoral. De hecho, estas señales de indiferenciación durante periodos

prolongados en las células son capaces de generar **células madre cancerígenas** (CSCs, del inglés *cancer stem cells*) (Lytle et al., 2018). Las CSCs son una subpoblación tumoral de células progenitoras capaces de iniciar el desarrollo tumoral, tanto primario como en focos metastásicos (**Fig. 1A**). Ya en 1877 se identificó una población tumoral que presentaba características embrionarias (Capp, 2019). A día de hoy, esta subpoblación se ha correlacionado con la agresividad, heterogeneidad tumoral y resistencia a la terapia (**Fig. 1B**). Pese a esto, el mecanismo no parece estar claro, pues parece que los tumores generados a partir de CSCs siguen una jerarquía unidireccional (Afify & Seno, 2019). Cuando se produce la iniciación tumoral, se piensa que las CSCs se dividen asimétricamente, manteniendo la reserva de progenitores. A diferencia del modelo de generación tumoral a partir de CSCs, el modelo de la evolución clonal indica que las células genéticamente inestables acumulan alteraciones genómicas con el tiempo, que aumentan la agresividad, resistencia, etc. Estos dos modelos no son excluyentes, lo que explicaría la heterogeneidad tumoral y las resistencias a los diferentes tratamientos (Shibata & Hoque, 2019).

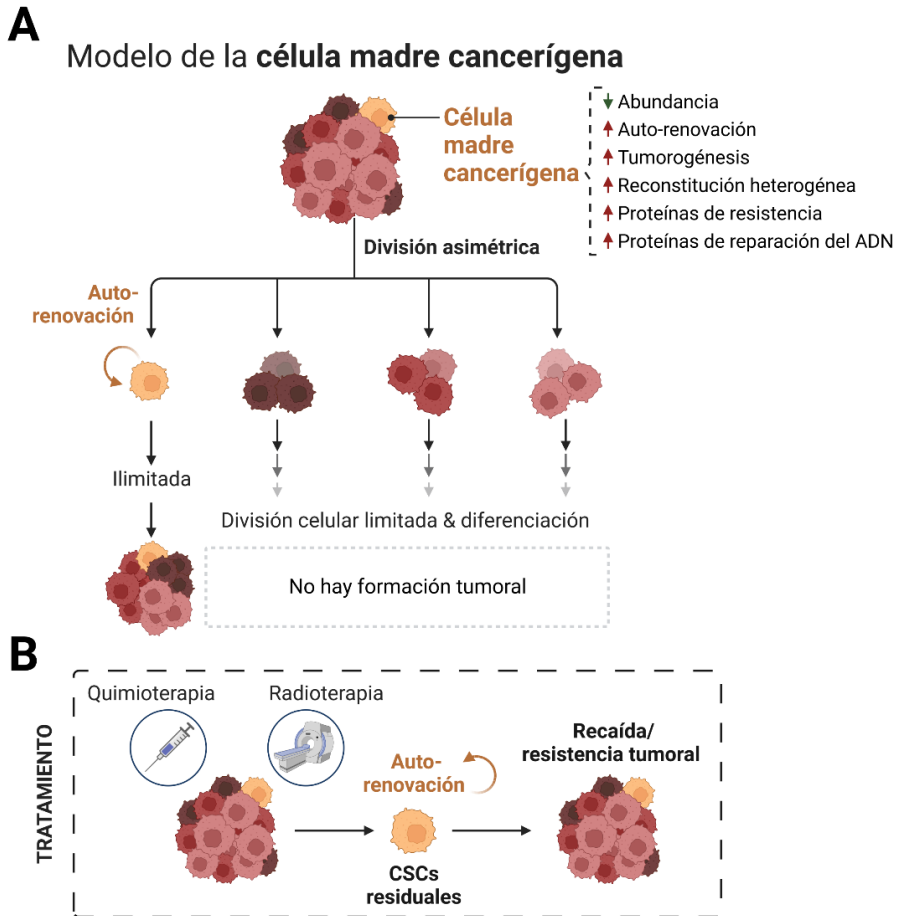


Figura 1. Modelo de formación tumoral de las células madre cancerígenas.

A) Proliferación y propiedades de las células madre cancerígenas (CSCs). Las CSCs presentan capacidad de división asimétrica, generando progenitores con capacidad de auto-renovación para el establecimiento tumoral. **B)** Recaída/resistencia tumoral al tratamiento de tumores enriquecidos en CSCs, generada como consecuencia de un residuo tumoral mínimo que, al ser rico en CSCs, presenta capacidad para establecer un nuevo tumor. *Creada con BioRender.com.*

CSC: célula madre cancerígena (del inglés *cancer stem cell*).

1.3.3. Microambiente tumoral

Uno de los mecanismos principales de los tumores sólidos y de algunos linfomas para permitir la progresión tumoral y favorecer la resistencia a distintas terapias es el **microambiente tumoral** (TME, del inglés *tumor*

microenvironment). El TME es una compleja red de interacciones entre componentes no celulares y celulares, donde abunda la presencia de células inmunorreguladoras con diversos estados fenotípicos y funcionales (**Fig. 2**). Todas las células del tumor están inmersas en una matriz extracelular, rica en citoquinas, factores de crecimiento, enzimas, proteoglicanos y glicoproteínas. La presencia de estos componentes no celulares asegura la estructura y homeostasis para la comunicación del tejido neoplásico (revisado en (Bożyk et al., 2022)).

Entre los principales componentes celulares del TME encontramos:

- **Células T reguladoras** (Tregs): las Tregs (células T CD4+ CD25+ FoxP3+) son la principal población de linfocitos responsable de la supresión de la actividad de otras poblaciones inmunitarias. Principalmente, inhiben la acción de las células T citotóxicas, así como de las células fagocíticas. La inmunosupresión se produce por dos mecanismos fundamentales, entre otros: 1) las Tregs consumen triptófano, esencial para que las células T citotóxicas induzcan inflamación a largo plazo, y 2) las Tregs producen metabolitos tóxicos como peróxido de hidrógeno u óxido nítrico, que inhibe el funcionamiento de otras células inmunitarias (Lei et al., 2020).
- **Células B**: las células B se conocen principalmente por favorecer la respuesta inmunológica. Sin embargo, dentro del TME, bajo la influencia de IL-10, y como consecuencia de la formación de complejos IgG, pueden promover la infiltración de células inmunosupresoras y la estimulación de la angiogénesis (Tsou et al., 2016).
- **Macrófagos asociados a tumor (TAM, del inglés *tumor associated macrophages*)**: generalmente, por su naturaleza citotóxica y fagocítica, los macrófagos se han considerado células

inmunoactivadoras. Sin embargo, dependiendo de las señales que reciban en el TME, pueden modificar su fenotipo asumiendo funciones pro – tumorales (M2) o anti – tumorales (M1). El TME suele estar infiltrado en mayor medida con M2 o TAMs, consecuencia de la influencia de IL-4, IL-10 e IL-13, inhibiendo la acción de las células inmunitarias citotóxicas (Kim & Bae, 2016).

- **Células dendríticas y NK:** en procesos de inflamación, las células dendríticas producen diversas sustancias (entre ellas TNF), que apoyan la acción de células T CD8+. Sin embargo, en el TME, las células neoplásicas secretan CXCL1, CXCL5, CCL2 y VEGF, lo que inhibe la maduración de las células dendríticas, ocasionando que adquieran funciones pro-neoplásicas (Verneau et al., 2020). Algo similar ocurre con las células NK, en las cuales un bloqueo en la maduración provoca la inhibición de su función (Q. Zhang et al., 2018).
- **Células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs, del inglés *myeloid-derived suppressor cells*):** las MDSCs son unas de los principales detonantes de la inmunosupresión de células inmunitarias en el TME. Se originan en la médula ósea, pero en el TME, favorecen el crecimiento neoplásico, metástasis y angiogénesis, debido a que se transforman en TAMs (Kumar et al., 2016).
- **Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, del inglés *cancer-associated fibroblasts*):** los CAFs son los principales generadores de colágeno del TME. Secretan múltiples citoquinas y factores de crecimiento, como TGF- β , IL-6 o CXCL2, entre otros, lo que promueve el desarrollo tumoral, angiogénesis y condensación de la matriz extracelular neoplásica. Su presencia se asocia a un mal

pronóstico de la patología (Ishii et al., 2016) (Monteran & Erez, 2019).

- **Células T colaboradoras foliculares:** este tipo celular presenta un papel importante en el TME de linfoma, mientras que no están presentes en el TME de tumores sólidos. Son células encargadas de la formación y el mantenimiento de los centros germinales, aunque en el entorno tumoral pueden favorecer la progresión tumoral mediante la sobreexpresión de vías de proliferación celular (Ng et al., 2022).

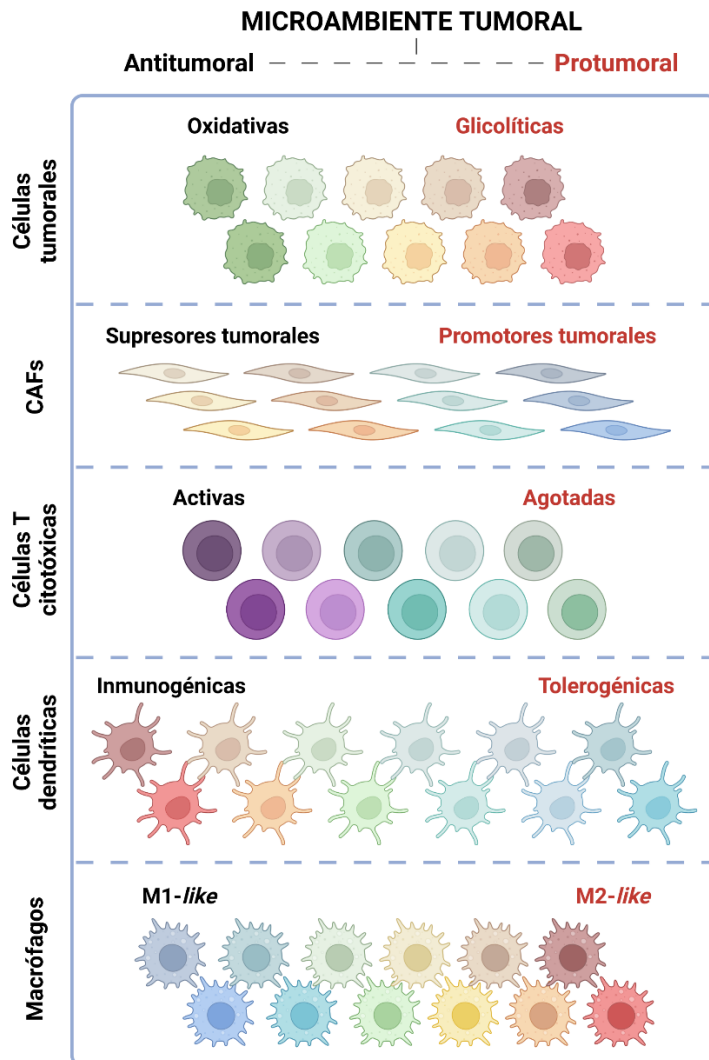


Figura 2. Principales células presentes en el microambiente tumoral y variación fenotípica y funcional de las mismas.

Se observa la modificación fenotípica y funcional de las principales células presentes en el microambiente tumoral, desde una situación de acción antitumoral hasta una situación de establecimiento tumoral. A la izquierda, se observa un entorno antitumoral; a la derecha, se observa una situación protumoral. *Creada con BioRender.com.*

CAFs: fibroblastos asociados a cáncer (del inglés *cancer associated fibroblasts*).

Basados en el nivel de invasión en el tumor de células inmunitarias, encontramos tres tipos de entornos tumorales: 1) tumores “**calientes**”, que presentan un alto grado de infiltración de células inmunológicas; 2) tumores “**fríos**”, sin ningún tipo de infiltración inmunitaria; y 3) tumores con **exclusión inmunológica**, donde las células inmunitarias se localizan en la periferia del tumor, limitando con la matriz extracelular (Gerard et al., 2021).

1.3.4. Cáncer de páncreas: una necesidad clínica no cubierta

Debido a la inmensa cantidad de cánceres clasificados en base al origen del tumor primario, en este manuscrito nos centraremos en el cáncer de páncreas, debido a que el modelo de tumor sólido utilizado corresponde a este tipo de neoplasia dada la urgencia de una herramienta terapéutica eficaz.

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer con peor pronóstico y menor supervivencia, y dentro de este tipo de cáncer, el adenocarcinoma pancreático ductal (APD) constituye el 90% de los casos. El APD surge en las células acinares del páncreas: estas presentan una elevada plasticidad, que permite la regeneración y homeostasis del páncreas. Las células acinares se transdiferencian hacia un fenotipo epitelial, que son similares a las células ductales (mediante la metaplasia acinar-ductal) cuando reciben ciertos estímulos ambientales (señales de daño tisular, estrés celular...). En

este proceso, las células acinares adquieren características de progenitoras, lo que las hace más susceptibles a mutaciones en proto-oncogenes, fundamentalmente en *KRAS*, transformándolas en neoplasias intraepiteliales pancreáticas (Orth et al., 2019). Este se considera el primer paso en el desarrollo de APD, que se consolida con el silenciamiento de ciertos genes supresores de tumores. Los principales genes supresores de tumores alterados encontrados en pacientes con APD son *TP53*, *CDKN2A* o *SMAD4* (Waddell et al., 2015).

Las alteraciones genómicas y transcriptómicas no son las únicas que determinan el APD, ya que los circuitos regulatorios epigenómicos (metilación de ADN y modificaciones post-traduccionales de histonas) y regulación por ARNs no-codificantes también determinan la progresión del APD (Iguchi et al., 2016).

Una de las características más identificativas del APD es su fuerte TME. Está basado en un estroma desmoplásico capaz de alcanzar hasta el 90% del volumen del tumor, cuyo origen se atribuye a los CAFs (Dougan, 2017). Este TME se caracteriza por la presencia de todo tipo de células inmunosupresoras que, junto a un fuerte entorno hipóxico (Daniel et al., 2019), representan una barrera prácticamente impenetrable para la infiltración de células T citotóxicas (Ene-Obong et al., 2013). Además, este entorno inmunosupresor se lleva a cabo por la presencia de citoquinas como TGF- β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-35, GM-CSF, CCL2, CXCL1 y CXCL13, lo que educa a las células inmunitarias y a las células tumorales (Johnson et al., 2017) (Roshani et al., 2014).

A nivel epidemiológico, el APD es la 4ª causa de muerte más frecuente relacionada con el cáncer a nivel mundial. Además, la supervivencia en 5 años es de menos del 8% (Orth et al., 2019). Una de las causas es que aproximadamente el 50% de los pacientes se diagnostican en una fase

avanzada, consecuencia de que el APD no presenta síntomas específicos hasta fases tardías, donde la cirugía no es ya una opción por la infiltración o por la diseminación metastásica. En el momento del diagnóstico, el 30% de los pacientes presentan un tumor localizado avanzado, y el 50% presenta metástasis. Las localizaciones principales de metástasis son hígado (90%), nódulos linfáticos (25%), pulmón (25%), peritoneo (20%) y huesos (10 – 15%) (Park et al., 2021).

En cuanto al tratamiento, los pacientes operables se someten a cirugía junto a FOLFIRINOX (fluorouracil, irinotecan, leucovorin, oxaliplatino). Para pacientes con tumor avanzado (no operable) localizado o metastásico, se aplican regímenes multiquimioterápicos (FOLFIRINOX, gemcitabina/nab-paclitaxel, nanoliposomal irinotecan/fluorouracil) junto a radioterapia. Debido a que los tratamientos presentan una eficacia moderada, múltiples ensayos clínicos buscan nuevas terapias, como terapias biológicas dirigidas (inhibidores de la señalización *MAPK*, inhibidores de *KRAS*, inhibidores de *PARP*) o inmunoterapias (anticuerpos monoclonales anti-PD1/CTLA-4, vacunas, anticuerpos anti-CD40 para atacar macrófagos, reprogramación de células dendríticas, o diferentes terapias CAR-T) (revisado en (Hosein et al., 2022)). Todo esto nos indica que el APD constituye una indicación de altísima necesidad clínica.

2. Papel antitumoral del sistema inmunitario

“El sistema inmunitario es un sistema complejo de células y factores solubles que trabajan de forma coordinada para mantener la integridad de nuestro organismo, y que incluye el defendernos de patógenos, rechazo de trasplantes incompatibles, vigilancia antitumoral y responder frente a señales de peligro (bien endógenas como exógenas)” (Sociedad Española de Inmunología). Además, el sistema inmunológico desempeña diferentes funciones en la homeostasis del cuerpo, como son la eliminación de células muertas, control de la inflamación, regulación del metabolismo y al mantenimiento de la microbiota.

La respuesta inmunológica está mediada por las diferentes células inmunitarias generadas en la médula ósea. La respuesta adaptativa se detona cuando las células T reconocen antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos (dendríticas y macrófagos principalmente), y se diferencian a células efectoras específicas de antígeno, mientras que las células B proliferan y se diferencian a células productoras de anticuerpos (Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001).

Pese a que el sistema inmunológico presenta una alta eficacia de eliminación de tumores, algunos pueden desarrollar mecanismos de escape o evasión del sistema inmunitario. De hecho, los tumores acaban progresando y moldeándose frente a la acción del sistema inmunológico por un proceso conocido como inmuoedición del cáncer.

2.1. Inmunoedición del cáncer

En 1909, el inmunólogo Paul Ehrlich postuló que el sistema inmunológico era capaz de reconocer y eliminar tumores tempranos en ausencia de ningún tipo de terapia. Este proceso se definió como inmunoedición del cáncer, un proceso dinámico donde el sistema inmunitario no solo es capaz de eliminar el tumor, sino que puede moldear su inmunogenicidad. Este proceso presenta tres fases que se llevan a cabo de manera secuencial o independiente: eliminación, equilibrio y escape (Borroni & Grizzi, 2021) (**Fig. 3**).

- **Fase de eliminación**

En esta fase, la inmunidad innata y adaptativa trabajan conjuntamente para detectar la presencia de tumores en estados de desarrollo tempranos y eliminarlos. Existen diferentes “señales de daño” que participan, por ejemplo, los interferones tipo I. Estos activan a las células dendríticas y promueven la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa, que provoca la lucha del sistema inmunológico frente al tumor (Schreiber et al., 2011).

- **Fase de equilibrio**

Parece haber consenso en que, durante la fase de eliminación, el sistema inmunológico es capaz de eliminar eficazmente células transformadas. Sin embargo, la alta tasa mutacional de las células transformadas les permite desarrollar, en ocasiones, mecanismos de evasión al ataque del sistema inmunitario. La fase de equilibrio es considerada un periodo de latencia en el crecimiento tumoral entre el final de la fase de eliminación y el principio de la fase de escape, donde el tumor ni es destruido, ni progresa.

La presión ejercida por el sistema inmunitario hacia el tumor durante esta fase de equilibrio permite que surjan nuevas variantes con sucesivas mutaciones que podrían hacerlas cada vez menos reactivas al sistema inmunitario. En definitiva, el tumor que surge de la fase de equilibrio puede haber sido moldeado para presentar una inmunogenicidad reducida como consecuencia de la continua presión inmunitaria, condicionando al tumor a que avance a la fase de escape (Dunn et al., 2004).

Una vez que un tumor entra en la fase de equilibrio tardío, presenta tres posibles destinos: 1) que sea eliminado por el sistema inmunológico, 2) mantenerse en una fase de equilibrio permanente o 3) escapar de la presión inmunitaria y alcanzar la fase de escape.

- **Fase de escape**

Los tumores que sobreviven a la fase de equilibrio entran en la fase de escape, donde pueden crecer de manera no restringida por los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, hasta ser clínicamente detectables.

Al escape tumoral contribuyen alteraciones en diferentes procesos: 1) la disminución de la presentación antigénica mediante la pérdida de expresión de HLA-I; mutaciones en TAP1 y en las subunidades del inmunoproteosoma LMP2 y LMP7 (Seliger et al., 2000); 2) fallos en genes relacionados con la señalización del receptor de interferón γ (IFN γ) como ocurre en el 25% de los tumores humanos de pulmón, que no responden a IFN γ (Kaplan et al., 1998); 3) producción excesiva de citoquinas inmunosupresoras, como TFG β o IL-10 (Khong & Restifo, 2002), relacionado con los tumores que presentan un fuerte TME; 4) sobreexpresión de inhibidores de la respuesta de las células T, como galectina-1 (Rubinstein et al., 2004), pudiendo además inducir señales

proinflamatorias (Wang et al., 2004); 5) mecanismos que contribuyen a la generación, activación o función de poblaciones de células T inmunosupresoras, como células NKT productoras de IL-13 o Tregs (Terabe & Berzofsky, 2004). Todos estos mecanismos, produciéndose de manera conjunta o por separado, contribuyen a que el tumor se desarrolle, favoreciendo la evasión de la acción inmunitaria.

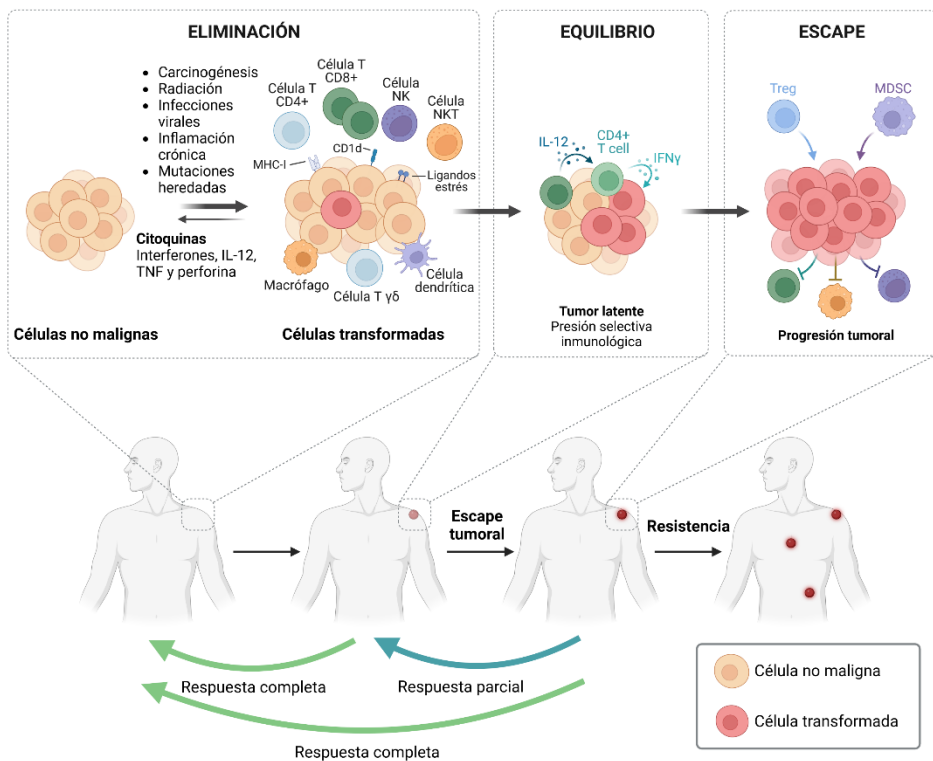


Figura 3. Fases del proceso de inmunoección del cáncer: eliminación, equilibrio y escape.

Como consecuencia de la acción de diversos factores, las células sanas pueden transformarse, y en la fase de eliminación, diversas células inmunitarias contribuyen a la eliminación tumoral. Si el tumor escapa a esta acción antitumoral, avanza a la fase de equilibrio, donde el tumor permanece latente. Debido a la fuerte presión selectiva ejercida por el sistema inmunitario hacia el tumor, pueden surgir variantes tumorales resistentes que avancen a la fase de escape, donde se establece el tumor hasta ser clínicamente detectable. Creada con BioRender.com.

TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*); MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (del inglés *major histocompatibility complex class I*).

2.2. Linfocito T y su papel antitumoral

Las células T son las encargadas del mantenimiento de la respuesta inmunitaria, homeostasis y memoria. Éstas presentan un receptor en su membrana capaz de reconocer patógenos y/o tumores, permitiendo también mantener una memoria inmunológica y un reconocimiento de antígenos propios. Además, están implicadas en los procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes.

Las células T se generan por los progenitores de la médula ósea y migran al timo, donde los progenitores T CD4⁻ CD8⁻ sufren el reordenamiento del TCR para generar timocitos CD4⁺ CD8⁺. Tras esto, se seleccionan células T positivas para CD4 o CD8 que migran a la periferia como células T *naïve* (CD45RA⁺ CCR7⁺). Dentro de las células T *naïve* CD4⁺, entre el 9-10% son Tregs (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺). Las células T *naïve* recirculan permanentemente entre los órganos linfoides secundarios y la sangre a través del sistema linfático, expresando marcadores de migración como CD62L. Cuando encuentran un antígeno y ligandos coestimuladores presentados por las células dendríticas, producen IL-2, lo que permite su proliferación y diferenciación a células T efectoras, listas para ejecutar una respuesta inmunitaria efectiva. Por otra parte, las Tregs desarrollan un papel protector crítico de tolerancia. Las células efectoras presentan un tiempo de vida corto, aunque cierta proporción sobrevive en un estadio memoria (células T memoria), una subpoblación heterogénea que contribuye al mantenimiento de una inmunidad a largo plazo, pudiendo facilitar una nueva respuesta inmunitaria en caso de ser necesaria (revisado en (Kumar et al., 2018)).

2.2.1. Células T *naïve*

Las células T *naïve* presentan tiempos de vida muy largos, entre 6-9 años. Su supervivencia y proliferación se favorece por factores homeostáticos, como IL-7 y los complejos MHC. En condiciones fisiológicas, estos factores favorecen el mantenimiento de estas células, sin llevarlas a un estado de diferenciación efector o memoria. De hecho, hasta que las células T no encuentran un antígeno y pasan a ser efectoras o memoria, se consideran *naïve*.

Las células T *naïve* humanas expresan CD45RA y no expresan el marcador asociado a memoria CD45RO. La expresión de un marcador *naïve* extra (CCR7, CD62L o CD27) permite distinguir las de células T efectoras terminalmente diferenciadas, que re-expresan CD45RA pero no CCR7, CD62L o CD27 (van den Broek et al., 2018). En la **Tabla 1** se resumen los marcadores asociados a las diferentes subpoblaciones de células T.

Tabla 1. Marcadores asociados a las diferentes subpoblaciones de células T.

	T _N	T _{SCM}	T _{CM}	T _{EM}	T _{EF}
CD45RA	+	+	-	-	+
CD45RO	-	-	+	+	-
CCR7	+	+	+	-	-
CD62L	+	+	+	-	-
CD28	+	+	+	+/-	-
CD27	+	+	+	+/-	-
IL-7R α	+	+	+	+/-	-
CXCR3	-	+	+	-	-
CD95	-	+	+	+	+
CD11a	-	+	+	+	+
IL-2R α	-	+	+	+	+
CD58	-	+	+	+	+
CD57	-	-	-	+/-	+

2.2.2. Células T troncales memoria

Las células T troncales memoria (T_{SCM} , del inglés *T stem cell memory*) constituyen la subpoblación de células T memoria menos diferenciada, y son capaces de reconstituir todas las subpoblaciones de células T memoria y efectoras mientras mantienen su propio *pool* para la auto-renovación, mediante divisiones asimétricas (Gattinoni et al., 2017).

Las T_{SCM} presentan un papel dual: por una parte, mantienen las propiedades de las células memoria (capacidad de proliferar rápidamente, liberar citoquinas proinflamatorias en respuesta a una re-exposición antigénica, y mantienen la capacidad de homeostasis por IL-7 e IL-15); por otra parte, pese a ser funcionalmente diferentes de las células T *naïve*, comparten con éstas ciertas características también, como la capacidad para recircular y distribución *in vivo*. En definitiva, las T_{SCM} presentan propiedades fenotípicas y funcionales intermedias ente las células T *naïve* y las células T memoria convencionales (Gattinoni et al., 2017).

A nivel terapéutico, se ha encontrado una herramienta muy interesante en las T_{SCM} para su uso en inmunoterapias adoptivas. De hecho, la administración de células T con expresión elevada de CD62L ($T_{SCM} + T_{CM}$) se ha relacionado con respuestas antitumorales más eficaces en pacientes (Gattinoni et al., 2005). De igual manera, se ha visto una mayor expansión y persistencia de las células T CD62L+ modificadas para expresar un CAR α CD19, lo que se ha traducido en una respuesta antitumoral más duradera (Gattinoni et al., 2009) (Gattinoni et al., 2011).

2.2.3. Células T memoria

Las células T memoria surgen como consecuencia de la exposición antigénica de células T *naïve*. Las células T CD45RO+ CD45RA- aúnan

un conjunto heterogéneo de poblaciones memoria. En 1999, Sallusto y colaboradores (Sallusto et al., 1999) identificaron por primera vez esta heterogeneidad en sangre periférica basándose en la expresión del marcador de migración a nódulos linfáticos CCR7. Las células T *naïve* expresan de manera estable CCR7, lo que se ve reflejado en que residen preferentemente en tejido linfático, mientras que las poblaciones memoria se dividen en: CD45RA⁻ CCR7⁺ (células T central memoria, T_{CM}), que también migran a tejido linfático, y CD45RA⁻ CCR7⁻ (células T efectoras memoria, T_{EM}), que migran a distintos tejidos periféricos (Farber et al., 2014), a parte de las T_{SCM} nombradas anteriormente.

Existen ciertas diferencias funcionales entre las T_{CM} y las T_{EM} periféricas: las T_{CM} presenta la frecuencia más alta de células productoras de IL-2, y liberan IFN γ y TNF α en niveles intermedios, mientras que las T_{EM} liberan mayores cantidades de IFN γ y TNF α , pero niveles bajos de IL-2.

2.2.4. Células T efectoras

Las células T efectoras surgen de la diferenciación de células T *naïve*, y son fundamentales para ejecutar las funciones inmunitarias. Funcionalmente, las células T CD8⁺ no suelen dividirse en subpoblaciones, pues en general producen IFN γ , TNF α y expresan marcadores citolíticos como perforina o CD107 (Zhang et al., 2010). Sin embargo, las células T CD4⁺ se dividen en:

- **Células Th1** (del inglés *T helper 1*): se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias, como IFN γ , TNF α y TNF β , estimulando las respuestas inmunológicas innatas y de células T. La respuesta Th1 tiende a presentar carácter citolítico, y participa fundamentalmente en la eliminación de patógenos, aunque también contribuye en la respuesta antitumoral. Sin embargo, las

propiedades proinflamatorias para la eliminación de patógenos y de tumores de la respuesta Th1 puede presentar efectos adversos, ya que puede causar daño tisular y detonar autorreactividad, pudiendo contribuir a la presencia de enfermedades de carácter inflamatorio, o a la aparición de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en pacientes que reciben trasplantes.

- **Células Th2:** son células productoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, lo que favorece el reclutamiento de eosinófilos. La respuesta Th2 contribuye a la eliminación de patógenos extracelulares, como helmintos o nematodos, y juegan un papel importante en la inmunidad de las mucosas. Respuestas Th2 excesivas contribuyen a la aparición de patologías inflamatorias crónicas.
- **Células Th17:** este subtipo celular se caracteriza por producir IL-17, aunque también producen otras citoquinas como IL-21 e IL-22. La respuesta Th17 presenta puntos en común con la Th1 y Th2, pero parece que se detona por la presencia de patógenos específicos, siendo además necesaria para su eliminación. Además, las células Th17 pueden estar implicadas también en la inducción y propagación de procesos autoinflamatorios.
- Encontramos otros tipos celulares minoritarios, como son las **Tregs** (explicadas anteriormente), las **células T colaboradoras foliculares** (que promueven la producción de anticuerpos de alta afinidad y de células B memoria) y las **células Th9** (que producen altos niveles de IL-9 e IL-10, y parece que están relacionados con las respuestas intestinales a helmintos) (revisado en (Wan & Flavell, 2009)).

2.3. Receptor de las células T

2.3.1. Estructura del complejo TCR:CD3

El **receptor de las células T** (TCR, de inglés *T cell receptor*):CD3 es un ejemplo canónico de un complejo formado por varias proteínas. Estructuralmente, este complejo presenta una alta diversidad genética, pues está formado por un heterodímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, unido no covalentemente con dímeros CD3: CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ y CD3 $\zeta\zeta$. El propio TCR media el reconocimiento antigénico por la unión a fragmentos peptídicos que están unidos al MHC de las células presentadoras de antígenos. Estos fragmentos peptídicos se producen por degradación proteolítica de proteínas extrañas o propias por las células que presentan MHC de clase I o II.

Las cadenas α y β contienen un dominio variable y constante similar al de una inmunoglobulina, un péptido de unión proximal a la membrana, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta, ocurriendo lo mismo en las subunidades CD3 $\epsilon\gamma$ y CD3 $\epsilon\delta$. El complejo CD3 ζ es ligeramente diferente, pues está formado por un residuo corto extracelular unido a un péptido de unión, dominio transmembrana y una región citoplasmática (Mariuzza et al., 2020). El complejo TCR:CD3 presenta una estequiometría 1:1:1:1 en todas sus subunidades (TCR α/β :CD3 γ/ϵ :CD3 δ/ϵ' :CD3 ζ/ζ) (Kuhns & Badgandi, 2012).

Los ligandos complementarios al TCR pueden dividirse en 2 clases: **MHC de clase I** y **MHC de clase II**. Los MHCs-I humanos son complejos de antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés *human leukocyte antigen*) (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y β 2-microglobulina, mientras que los MHCs-II son heterodímeros de varios HLAs (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR). Todas las células nucleadas pueden presentar antígenos unidos a MHC-I, siendo reconocidos por células T CD8+, mientras que las células

presentadoras de antígenos (entre las que encontramos células B, macrófagos o células dendríticas) presentan antígenos por MHC-II a células T CD4+.

2.3.2. Señalización del TCR

La activación de las células T requiere no solo la interacción del TCR (señal 1), sino también una segunda señalización proveniente de dominios coestimulatorios (como CD28) para evitar la entrada de la célula T en anergia y, para alcanzar finalmente un estado efector completo, requiere también de una tercera señal soluble, por ejemplo, una citoquina.

Cuando la célula T interacciona con la célula diana o la célula presentadora de antígenos, se genera una estructura conocida como sinapsis inmunológica, primer paso que detona la señalización en la célula T.

En primer lugar, la activación del TCR inicia la señalización proximal en cuestión de segundos, una activación temprana iniciada por un conjunto de proteínas tirosín quinasas (PTKs) (que incluyen las tirosín quinasas Lck y Fyn de la familia Src, así como ZAP70). Lck permanece activo de manera basal (Nika et al., 2010), y se puede encontrar en tres formas: soluble, anclada a la membrana o unida al receptor (Kim et al., 2003). Tras el reconocimiento antigénico, el complejo TCR:CD3 recluta a Lck para fosforilar los motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM, del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) de las subunidades de CD3 (Reth, 1989). La fosforilación de ITAM provoca el reclutamiento de ZAP70, lo que inicia una serie de fosforilaciones en cascada, imprescindible para la transmisión de la señal a los complejos posteriores (Teppert et al., 2022).

Esta señalización proximal detona la activación de múltiples cascadas de señalización distales, como la ruta calcio/NFAT, la ruta Ras/ERK/AP-1/NF- κ B y la ruta PI3K/AKT/mTOR, que con la ayuda de mensajeros secundarios y diferentes proteínas adaptadoras, detonan finalmente los efectos fenotípicos y funcionales característicos de las células T (Teppert et al., 2022) (Shah et al., 2021) (**Fig. 4**).

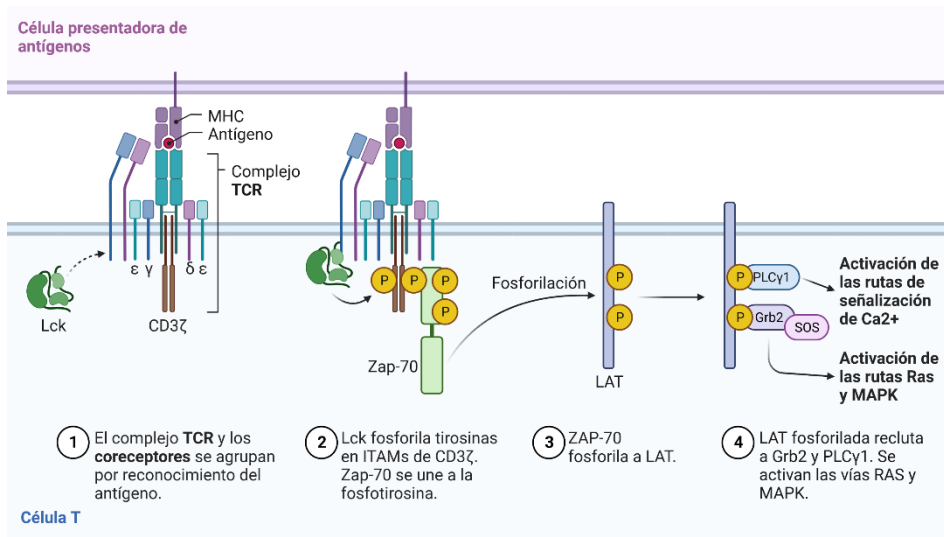


Figura 4. Señalización del complejo del TCR tras el reconocimiento antigénico.

Tras el reconocimiento antigénico, el complejo TCR y los co-receptores reclutan a Lck, que fosforila a los dominios ITAM de las subunidades de CD3, lo que provoca el reclutamiento de ZAP70, fosforilando a LAT. La fosforilación de LAT recluta a PLCy1 y a Grb2, lo que denota las distintas rutas de activación. *Creada con BioRender.com.*

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*); TCR: receptor de la célula T (del inglés *T cell receptor*).

2.3.3. Reciclaje y degradación del TCR

El mantenimiento de ciertos niveles de expresión del TCR en la membrana es esencial para garantizar una respuesta T efectiva. Este proceso está regulado por endocitosis (donde las células incorporan

material externo absorbiéndolo dentro de la membrana celular), participando en la degradación y reciclaje de los receptores.

La internalización del TCR es un proceso esencial para regular la respuesta general (y antitumoral en particular) de las células T, ya que un fallo en este proceso puede derivar en un estado de hiperactivación y consecuente agotamiento prematuro de las células T (Vardhana et al., 2010).

2.4. Mecanismos de disfunción de las células T

La reacción de las células T frente a estímulos de diferentes duraciones genera distintos efectos en la impronta de éstas. Ante encuentros puntuales (por ejemplo, infecciones agudas), las células T *naïve* se diferencian rápidamente a células T_{EF}, lo que incluye una reprogramación transcripcional, epigenética y metabólica para conferirles función efectora, muriendo rápidamente y conservándose una pequeña fracción como células memoria. Sin embargo, ante estimulaciones continuas (como infecciones crónicas o cáncer), la función efectora de las células T se puede ver comprometida con la exposición antigénica permanente (Kaech & Cui, 2012).

Las células T agotadas (T_{EX}, del inglés *exhausted T cells*) difieren de las células T anérgicas o senescentes, ya que las células T anérgicas se generan por una estimulación incompleta, mientras que las senescentes son células T que han alcanzado un estado terminalmente diferenciado irreversible, consecuencia de arresto del ciclo celular y acortamiento de telómeros (Akbar & Henson, 2011). Sin embargo, la inducción de las T_{EX} puede surgir por diferentes mecanismos:

- **Disfuncionalidad por receptores inhibitorios (RI):** una de las principales características de las T_{EX} es la sobreexpresión de

múltiples RI, principalmente PD-1, LAG3, TIM3 y CTLA-4, pues parece haber consenso en que un mayor número de RI está asociado con un estado disfuncional más profundo. Sin embargo, estos marcadores se han asociado clásicamente a activación, ya que las T_{EF} funcionales expresan transitoriamente PD-1 o LAG3 tras estimulación antigénica, por ejemplo (Araki et al., 2013). De hecho, estos receptores cumplen una función fisiológica de control de la autorreactividad, teniendo un rol regulatorio negativo (Sharpe et al., 2007). Es la expresión elevada a largo plazo de estos receptores la que se correlaciona con agotamiento celular, y existen evidencias de que el bloqueo simultáneo de varios RI es capaz de revertir estados de disfuncionalidad de células T y potenciar su acción antitumoral (Chauvin et al., 2015) (Fourcade et al., 2010) (Woo et al., 2012).

- **Disfuncionalidad por el TME:** previamente, ya hemos comentado la importancia de las células inmunosupresoras en el TME, y cómo afectan a la inhibición inmunitaria y a la progresión tumoral. Además, a nivel metabólico, existen diversas rutas implicadas en la inmunidad antitumoral en el TME, como la glucólisis aeróbica, el metabolismo de aminoácidos, la glutaminólisis y la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Maclver et al., 2013). En el TME, existe una competencia por la glucosa entre las células tumorales y los TILs, lo que deriva en una inhibición de la función de las células T por la restricción de glucosa (Chang et al., 2015). Determinados aminoácidos presentan también un papel esencial tanto en la estimulación de las células T como en proliferación de las células tumorales: un ejemplo es la arginina, necesaria para la activación y proliferación de las células T; en el TME, los TAMs y las MDSCs expresan arginasa I, que reduce la arginina, deteriorando la función

efectora T (Rodríguez et al., 2009). De manera similar ocurre con la glutamina, esencial para la actividad de las células T, que es secuestrada por las células tumorales para favorecer la progresión tumoral (Altman et al., 2016). Otros factores característicos del TME que juegan un rol importante en la disfunción de las células T son el ácido láctico tumoral, que puede inducir la apoptosis de las células T *naïve* (Xia et al., 2017), o la hipoxia, que puede tener un papel dual; por una parte, en modelos murinos se ha visto que cierta cantidad de hipoxia puede mejorar la acción antitumoral (Doedens et al., 2013) (Gropper et al., 2017); por otra parte, la sobreexpresión del factor de transcripción 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) incrementa el número de RI, lo que deriva en una función efectora reducida (Liu et al., 2021).

La regulación a nivel transcripcional es fundamental en la disfunción de las células T. Entre ellos, los factores de transcripción T-bet y Eomes juegan un papel fundamental en el desarrollo efector y memoria de células T CD8+. En procesos tumorales, a diferencia de en infecciones agudas, se requiere la participación coordinada tanto de T-bet como de Eomes para generar células T disfuncionales. Existen también otros factores de transcripción implicados en la disfunción de células T, como Foxo1, Blimp-1, NFAT, IRF-4 y BATF, que pueden promover o inhibir la disfunción. Recientemente, se ha comprobado que un nuevo factor de transcripción, TOX, promueve la disfunción de las células T en procesos tumorales (Xia et al., 2019).

Otro de los procesos relacionados con la pérdida de función de las células T es la muerte de éstas, consecuencia de la activación. Este fenómeno se conoce como muerte inducida por activación (AICD, del inglés *activation-induced cell death*), y ocurre cuando se produce una bajada de la respuesta de células T después de la eliminación

antigénica. Esto se produce como un mecanismo regulador negativo ya que, tras repetidas estimulaciones con altas dosis de antígeno, el sistema inmunitario frena la proliferación descontrolada de células T para evitar la autorreactividad. Esta señal de parada puede llevar a las células T a entrar en apoptosis, sobreexpresando marcadores como Fas (que interacciona con FasL para inducir la apoptosis) o TRAIL. A diferencia del proceso del agotamiento, este fenómeno es irreversible (Huan et al., 2022).

3. Inmunoterapia antitumoral

Como se ha comentado durante el capítulo anterior, el papel del sistema inmunitario en la eliminación de tumores es fundamental. Sin embargo, no es un mecanismo perfecto, ya bien sea por la capacidad de evasión de la vigilancia del sistema inmunitario que desarrollan los tumores, o por la disfuncionalidad de las células T. Debido a la toxicidad severa, así como a la falta de especificidad de los tratamientos convencionales contra el cáncer, han surgido alternativas como son las diferentes inmunoterapias.

La **inmunoterapia** se basa en la sensibilización o ingeniería del sistema inmunitario para atacar al cáncer. Los diferentes tipos de inmunoterapia buscan modificar la respuesta inmunológica del paciente de diferentes maneras con el objetivo de incrementar la especificidad y reducir los efectos secundarios. Sin embargo, esto no significa que esté exenta de efectos secundarios, principalmente relacionados con la alteración de la homeostasis inmunitaria consecuencia de la modificación de la respuesta inmunológica (Tan et al., 2020). Aun teniendo esto en cuenta, el buen balance eficacia versus seguridad de la inmunoterapia del cáncer la llevó a conseguir la designación de “Descubrimiento del año” en 2013 por Science (Couzin-Frankel, 2013).

3.1. Terapia con citoquinas

Las citoquinas son los agentes inmunomoduladores por excelencia, actuando como mensajeros que orquestan las comunicaciones celulares del sistema inmunitario. Ciertas citoquinas propagan la señalización inmunológica generando respuestas coordinadas para atacar antígenos (Waldmann, 2018). Una de las que primeramente se utilizó fue IL-2, por su habilidad para expandir células T *in vitro* e *in vivo*

y sus propiedades inmuno-activadoras para tratar ciertos cánceres metastásicos (Aldesleukin/Proleukin®, aprobado por la FDA para cáncer renal y melanoma) (Quijano-Rubio et al., 2020). Otro ejemplo es IFN α , capaz de provocar la eliminación de células tumorales mediante la estimulación de la maduración de células dendríticas y células T citotóxicas, lo que ha llevado a resultados positivos en neoplasias hematológicas y melanoma (Intron A®, aprobado por la FDA para leucemia, linfoma y melanoma) (Han et al., 2020). Sin embargo, debido a la alta toxicidad y a la baja tolerabilidad, la administración directa de citoquinas se aplica usualmente en combinación con otras inmunoterapias.

3.2. Inhibidores de puntos de control inmunológicos (ICIs)

Los puntos de control inmunológicos están formados por moléculas relacionadas con distintas rutas de señalización encargadas de mantener la tolerancia inmunológica (Pardoll, 2012). Suelen ser utilizadas por células cancerígenas para evadir la inmunovigilancia (Chen & Flies, 2013). Los ICIs se basan en bloquear estas interacciones inhibitorias para promover la eliminación tumoral, siendo las dianas más usadas PD-1, PD-L1 y CTLA-4 (Sharma & Allison, 2015).

En paralelo, se descubrió que las células T expresaban tanto CTLA-4 (Walunas et al., 1994) como PD-1 (Ishida et al., 1992), pero el mecanismo de éste no se corroboró hasta el descubrimiento de PD-L1 en tejidos normales (Dong et al., 1999). Se corroboró que el eje PD-1/PD-L1 participa en la regulación de la inmunotolerancia, suprimiendo la proliferación mediada por TCR y la secreción de citoquinas (Freeman et al., 2000). Se observó que las células tumorales presentaban una expresión anormal de PD-L1 (Iwai et al., 2002), por lo que se realizaron estudios que corroboraron que la inhibición de este eje reactivaba la

acción citotóxica de las células T, consiguiendo resultados clínicos remarcables (por ejemplo, mediante la aprobación de Atezolimumab/Tecentriq®, inhibidor de PD-L1, utilizado en el tratamiento de cáncer de pulmón y urotelial). De igual manera ocurrió con la inhibición de CTLA-4, que ha cosechado también éxitos clínicos (por ejemplo, la aprobación de Ipilimumab/Yervoy® para el tratamiento del melanoma avanzado) (Akkin et al., 2021).

Tal ha sido la relevancia del bloqueo de los puntos de control inmunitario que les hizo ganar el premio Nobel de Medicina y Fisiología a Tasuku Honjo y James Allison en 2018 (Huang & Chang, 2019). Pese a los resultados conseguidos, el efecto de los ICIs es dependiente en gran medida del tipo de tumor, por lo que solo un grupo de pacientes se puede beneficiar de éstos. Es por esto por lo que, generalmente, se suelen aplicar en combinación con otros tratamientos. Además, existen también diversos anticuerpos monoclonales aprobados dirigidos no a puntos de control inmunitario, sino a antígenos tumorales, como Rituximab/MabThera®/Rituxan® (anti-CD20 para el tratamiento de NHL), Trastuzumab (anti-HER2 para cáncer de mama) o Cetuximab (anti-EGFR para cáncer colorrectal), entre otros (Akkin et al., 2021).

Finalmente, también han generado resultados relevantes los anticuerpos derivados de células T, conocidos como *BITEs* (del inglés *bi-specific T-cell engagers*), anticuerpos multivalentes que reconocen CD3 y un antígeno tumoral, actuando como “enganche” entre las células T y las células tumorales (Dreier et al., 2002) (Jiménez-Reinoso et al., 2022).

3.3. Vacunas

Las vacunas contra el cáncer se basan en la utilización de antígenos tumorales específicos para detonar respuestas inmunitarias mediadas

por células T, intentando de esta manera eliminar el tumor y evitar recaídas (Zhang & Zhang, 2020). Además de antígenos tumorales, se han obtenido resultados clínicos remarcables con vacunas basadas en células dendríticas, por su alta capacidad de presentación antigénica. El procedimiento se basa en la reinfusión de estas células dendríticas aisladas, que previamente han sido expuestas a antígenos tumorales, y estimuladas para su maduración *ex vivo* (Mastelic-Gavillet et al., 2019). Un caso de éxito es Sipuleucel-T/Provenge®, la primera vacuna contra el cáncer comercial, una vacuna basada en células dendríticas para el tratamiento del cáncer de próstata refractario a terapia hormonal (Kantoff et al., 2010) (Handy & Antonarakis, 2018).

3.4. Transferencia celular adoptiva

La transferencia celular adoptiva utiliza células inmunitarias autólogas, en particular células T, para atacar al tumor. Se aíslan las células T a partir de sangre periférica del paciente, estas se pueden modificar genéticamente o no, se expanden *ex vivo*, y se reinfunden en el paciente (Gorabi et al., 2020).

El inicio de esta terapia se basa en los estudios de Rosenberg y colaboradores, que demostraron que la administración de células T citotóxicas autólogas activadas junto a grandes cantidades de IL-2 eran efectivas para tratar cánceres metastásicos (Rosenberg et al., 1985). Tras esto, estudios posteriores demostraron que la administración de linfocitos infiltrantes tumorales (TILs, del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*) expandidos *ex vivo* con IL-2 mostraban aún más potencia terapéutica (Rosenberg et al., 1986) (Rosenberg et al., 1988). Los TILs son linfocitos que ya se han infiltrado en el tejido tumoral, por lo que presentarán cierta ventaja citolítica frente a linfocitos extratumorales. Estos estudios sentaron las bases para la aplicación de la terapia TIL

actual que, pese a haber supuesto un avance en el tratamiento de ciertos tumores sólidos, presenta como principal inconveniente la calidad/cantidad de linfocitos que se pueden obtener para la reinfusión (Paijens et al., 2021).

Con el objetivo de sobrepasar estas limitaciones, se comenzaron a explorar terapias celulares adoptivas donde los linfocitos T se modificaran genéticamente, encontrando principalmente dos tipos: las células T modificadas con TCRs y las células T modificadas con receptores de antígeno quiméricos (CARs, del inglés *chimeric antigen receptors*). Tanto la terapia TCR-T como la terapia CAR-T, a diferencia de la terapia con TILs, permite dirigir a las células T a un antígeno específico. La terapia TCR-T surgió por estudios de Clay y colaboradores, que demostraron que la transferencia del gen del TCR a células T de sangre periférica de pacientes con melanoma permitía generar células T citotóxicas capaces de presentar reactividad *in vitro* (Clay et al., 1999). Esto se confirmó posteriormente con pacientes con melanoma metastásico, donde las células T con TCRs modificados consiguieron cierta regresión tumoral (Morgan et al., 2006). En cuanto a la terapia CAR-T, en lugar de TCRs, se utiliza un receptor sintético diseñado acoplando la región de reconocimiento de un anticuerpo (para seleccionar el antígeno diana) junto a diversos dominios, que permiten la transducción de la señal a la célula T para la acción citotóxica. La terapia CAR-T se explicará en profundidad en secciones posteriores, pero cabe destacar que presenta una ventaja única con respecto a los TILs o TCRs sintéticos, y es que el CAR es capaz de reconocer antígenos de manera no restringida por el HLA (Sternier & Sternier, 2021). Tanto la terapia TCR-T como la terapia CAR-T han supuesto avances críticos en el tratamiento de múltiples tipos de cáncer, obteniendo respuestas antitumorales sostenidas en el tiempo.

4. Herramientas para la modificación genética de células T

La **terapia génica** constituye una forma de medicina molecular basada en la inserción o eliminación de material genético funcional para proveer a las células de funciones extra o de corregir disfunciones en las mismas (Razi Soofiyan et al., 2013). La terapia génica surgió con el objetivo de corregir enfermedades monogénicas, pero hoy en día se considera una opción para pacientes con diversas enfermedades consideradas incurables hasta hace no demasiado tiempo, suponiendo una curación o un incremento sustancial en su calidad de vida. Esto se ha visto reflejado en la grandísima evolución de la terapia génica que, desde el primer ensayo clínico iniciado en 1990 (Blaese et al., 1995), actualmente cuenta con 13 medicamentos aprobados por la FDA.

La terapia génica aporta un arsenal de herramientas para cumplir su función. Las estrategias fundamentales son dos, la terapia génica *in vivo* y *ex vivo*. La estrategia *in vivo* consiste en la administración directa de las herramientas de terapia génica, mientras que la estrategia *ex vivo* consiste en la extracción de las células, modificación *in vitro*, y reinfusión en el paciente. En este manuscrito nos centraremos en las estrategias *ex vivo*, que son las principalmente utilizadas en el campo de la terapia CAR-T.

Aunque varios tipos celulares como las HSCs (Kimbrel & Lanza, 2020), células B (Hartweg et al., 2019) o macrófagos (Klichinsky et al., 2020) presentan propiedades muy interesantes para su utilización en inmunoterapias, la modificación de células T ha sido la más explorada por ser el punto final de la respuesta inmunitaria. La intensa investigación en el mecanismo del VIH ha permitido generar vectores virales con alta capacidad de transducción de células T. De hecho, se

ha comprobado que estas células T modificadas presentan capacidad de mantenerse vivas durante mucho tiempo, llegando en algunos casos incluso a durar décadas (Scholler et al., 2012) (Melenhorst et al., 2022). Por último, el hecho que las células T sufran grandes reordenamientos genómicos para generar TCRs únicos permite inferir que pueden ser capaces de sobrevivir sin alteraciones funcionales importantes a diversos tipos de modificaciones genéticas.

4.1. Adición génica

Los métodos de adición génica consisten en la introducción de material genético en las células diana, en nuestro caso, en células T. De manera general, los métodos pueden ser virales o no virales, permitiendo a su vez una integración estable o transitoria.

4.1.1. Métodos virales de integración estable

La transducción viral es uno de los métodos más utilizados en la modificación de células T, y principalmente se siguen estrategias basadas en la utilización de vectores retrovirales (gamma-retrovirales o lentivirales) ya que permiten una integración estable de los transgenes en el genoma de las células T.

Los retrovirus son virus con un genoma de ARN de cadena simple formado por al menos 4 genes: *gag* (que codifica la poliproteína estructural principal para el ensamblaje de las partículas virales inmaduras), *pro* (que codifica para la proteasa viral que facilita la maduración de las partículas), *pol* (que codifica la reverso transcriptasa y la integrasa) y *env* (que codifica las glicoproteínas de la superficie viral que median la interacción con el receptor celular para la fusión).

Los vectores derivados de los virus gamma-retrovirales (γ RVs) fueron de los primeros en desarrollarse. Se han usado ampliamente debido a

su capacidad de integración permanente en el genoma, permitiendo una expresión estable a lo largo de sucesivas divisiones de las células modificadas. Los γ RVs basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (MoML) se han usado ampliamente en clínica para el tratamiento de cáncer, enfermedades monogénicas y SIDA (Robbins & Ghivizzani, 1998). Sin embargo, estos vectores no están exentos de riesgos, ya que su integración en el genoma celular abre la puerta a posibles inserciones mutacionales y activación de oncogenes, debido a que la integración es parcialmente aleatoria (tendiendo los sitios de inserción a agruparse cerca de sitios de inicio de transcripción) (Romano, 2012). Además, es importante considerar la célula diana, ya que los γ RVs necesitan cruzar la membrana nuclear para la integración, pudiendo modificar exclusivamente a células en procesos activos de división (Ghosh et al., 2020).

Derivados de los lentivirus, un tipo de retrovirus, se desarrollaron los vectores lentivirales (VLs), los vectores más utilizados en modificación de células T. La mayoría de VLs derivan del genoma del VIH-1 (aunque también los hay que derivan de otros lentivirus de diferentes especies), y mantienen su capacidad de integración estable en el genoma de las células diana (Liu & Berkhout, 2014). En la segunda generación de los VLs, todos los genes de HIV-1 son eliminados del plásmido vector manteniendo los LTRs y la señal de empaquetamiento intactos. En esta generación, el plásmido empaquetador expresa la poliproteína Gag-Pol, junto a Tat y Rev y el plásmido de la envuelta expresa una proteína Env heteróloga (muy a menudo VSV-G). En la tercera generación de VLs, la región U3 del LTR 3' es sustituida por un promotor fuerte, haciendo la producción de estos VLs independiente de Tat. Esto permite que el plásmido empaquetador solo tenga que expresar Gag-Pol y que Rev se pueda expresar con un 4º plásmido (Ramezani & Hawley, 2002) (Vink et

al., 2017). En definitiva, el objetivo es minimizar la posibilidad de generación de eventos replicativos con el objetivo de aumentar la seguridad.

Los VLs presentan la capacidad de modificar células no proliferativas o de proliferación lenta, como las células *stem* CD34+, lo que ha permitido tratar múltiples patologías como la β -talasemia (Nienhuis & Persons, 2012), la leucodistrofia metacromática (Sessa et al., 2016) o el síndrome de Wiskott-Aldrich (Singh et al., 2017). Los VLs han sido utilizados para modificar genéticamente células T para conferirles potencial antitumoral, mediante la entrega de TCRs específicos o de CARs. Aunque el primer ensayo clínico con un CAR se realizó con γ RVs a finales de 1990 (Braendstrup et al., 2020) dirigiéndose a CD4, los VLs se han consolidado como herramienta de elección por la eficiencia de transducción, estabilidad de expresión y seguridad. Los VLs presentan una limitación en el tamaño del cargo, siendo inversamente proporcional al título viral (Kumar et al., 2001). Además, se está estudiando actualmente los efectos en la sobreexpresión o eliminación de proteínas consecuencia de la inserción en células T. Esto se observó, por ejemplo, en un paciente infundido con CAR-T antiCD19, donde, mediante *deep sequencing* del TCR, se observó que una población clonal proveniente de una sola célula CAR-T fue la responsable de la remisión completa y de la repoblación del 94% de las células T en sangre periférica. Cuando se analizó el sitio de integración, se vio que alteró la expresión de *TET2* (un gen supresor de tumores), causando la pérdida de función del gen, incrementando la proliferación, la proporción de células T_{CM} y modificando la secreción de citoquinas (aunque esto no solo no llevó a la transformación oncogénica, sino que llevó a consolidar la disrupción de *TET2* como candidato para la terapia CAR-T) (Fraiatta, Nobles, et al., 2018). En definitiva, los ensayos clínicos

y los productos aprobados por la FDA a lo largo de los años han demostrado la firme seguridad de los VLs.

4.1.2. Métodos no virales de integración estable

Una de las principales ventajas de la utilización de métodos no virales es la disminución del alto coste y la facilidad en la producción (Moretti et al., 2022).

Destacan los **transposones de ADN**, elementos genéticos móviles capaces de integrarse en el genoma de las células huésped. El mecanismo general de los transposones es tipo “cortar y pegar”: la transposasa se une a los sitios de unión en las repeticiones invertidas terminales, permite el ensamblaje del complejo de extremo pareado, cataliza la escisión del elemento fuera de su sitio de origen y finalmente integra el transposón en su nueva ubicación. El ADN se inserta sin necesidad de una secuencia de homología. La transposasa se entrega en configuración *trans*, para evitar la expresión residual, lo que podría llevar a la removilización de los transposones a otras localizaciones genómicas.

Una de las posibilidades para generar células CAR-T con sistemas basados en transposones es la entrega de los dos plásmidos (transposasa y gen de interés, del inglés *gene of interest*) o de ARN (transposasa) y plásmido (GOI) mediante electroporación de las células T. Estos sistemas presentan ciertas ventajas con respecto a los vectores más allá del precio, como el tamaño del cargo, que puede ser mucho mayor. Además, son versátiles, poco inmunogénicos y fáciles de producir. Sin embargo, la principal desventaja hasta hace poco ha sido la baja eficiencia de transducción en comparación con los vectores virales, que puede deberse a la toxicidad asociada a la electroporación del ADN (Moretti et al., 2022).

Los dos sistemas no virales utilizados para la producción de células CAR-T son *PiggyBac* (PB) y *Sleeping Beauty* (SB) (revisado en (Sandoval-Villegas et al., 2021)). En el caso de PB, existe una preferencia de integración en regiones génicas, lo que ha llevado a considerar potenciales problemas de bioseguridad. Aunque en el ensayo clínico australiano CARTELL (ACTRN12617001579381) se generaron células CAR-T antiCD19 usando este sistema y se consiguieron resultados similares a los obtenidos con VLs, 2 de 10 pacientes desarrollaron un tumor maligno de células CAR-T. Estas células malignas mostraron 24 copias del transgén, y ambos pacientes mostraron una integración intrónica en el gen *BACH2*, asociado con el desarrollo de linfomas T (Micklethwaite et al., 2021). Sin embargo, este gen es uno de los genes donde más frecuentemente se integra VIH-1, a pesar de que cuya integración no se ha asociado nunca a un evento de transformación oncogénica (Cesana et al., 2017), por lo que la correlación entre la oncogénesis y esta inserción sigue bajo estudio. Esto es algo que nunca ha ocurrido con SB, que presenta un perfil de integración prácticamente aleatorio. Se ha analizado sangre periférica de pacientes tratados con CAR-T generados con SB y no se ha observado un patrón de inserción en sitios de inicio de transcripción o promotores, manteniéndose (incluso a tiempos largos) una alta policlonalidad y diversidad de poblaciones (Magnani et al., 2020). Además, se están llevando a cabo intensos esfuerzos en reducir la toxicidad asociada a la electroporación de ADN, mediante la sustitución del ADN de la transposasa por ARNm o proteína (Querques et al., 2019), o mediante la entrega del transposón mediante minicírculos (Monjezi et al., 2017).

Otro de los métodos no virales que se ha aplicado para la generación de células CAR-T se basa en el uso de sistemas de **edición genómica**, principalmente en CRISPR-Cas9 (ya que sus alternativas, ZFNs y

TALENs, requieren un proceso laborioso de optimización de proteínas para cada una de las secuencias de ADN a reconocer). Generalmente, Cas9 se entrega de manera transitoria (como proteína recombinante), acompañada de un ADN donador con brazos de homología, que permiten la integración en el locus complementario a los brazos que flanquean al gen de interés mediante recombinación homóloga, introduciéndose el conjunto generalmente mediante electroporación. Pese a que este ADN donador ha resultado muy eficaz cuando se entrega en un AAV, se han explorado también alternativas no virales como, por ejemplo, la introducción como producto de PCR (Ode et al., 2020). Además, generalmente el CAR se introduce de manera dirigida en un locus que se desea interrumpir, como el TCR (para evitar la EICH) o PD-1 (para inhibir el eje inmunosupresor PD-1/PD-L1), consiguiendo la expresión del CAR y la interrupción génica de manera simultánea (J. Zhang et al., 2022).

4.1.3. Métodos no virales de expresión transitoria

Entre los métodos no virales no integrativos, son muy pocos los que se han aplicado en la modificación de células T con CARs. El principal es la introducción ARNm por electroporación o mediante nanopartículas (Kowalski et al., 2019). Cuando el ARNm llega al núcleo, se traduce en la proteína de interés, que generalmente se pierde de 2 a 4 divisiones. Aunque a nivel de seguridad evitaría potenciales riesgos genotóxicos asociados a otras formas de entrega (ya que no hay integración, y se apoya con toda la investigación generada a raíz de la vacuna del SARS-CoV2), parece que a nivel estructural carece de sentido expresar CARs de manera transitoria, dado que que la potencia se limitaría a un cortísimo plazo. Sin embargo, se han realizado aproximaciones dirigiendo el CAR a antígenos expresados también en tejidos sanos, siendo necesarias dosis periódicas. No obstante, Maus y colaboradores

reportaron un caso de shock anafiláctico severo consecuencia de la continua reinfusión de ARNm CAR, debido probablemente a la inmunogenicidad generada por el origen murino de la región de reconocimiento del CAR (Maus et al., 2013).

5. Receptores de antígeno quiméricos

5.1. Estructura y biología de los CARs

Los **receptores de antígeno quiméricos** (CARs, del inglés *chimeric antigen receptors*) son receptores de fusión que permiten dirigir a las células que lo presentan hacia un antígeno específico para un reconocimiento independiente del MHC. La estructura convencional del CAR presenta 3 módulos: el ectodominio, el dominio transmembrana y el endodominio (C. Zhang et al., 2017) (**Fig. 5A**).

5.1.1. Ectodominio

El ectodominio es la parte del CAR que se encuentra fuera del citoplasma, expuesta al espacio extracelular. Está formado por la región de reconocimiento del antígeno y por la región bisagra.

5.1.1.1. Dominio de reconocimiento de antígeno

El dominio de reconocimiento canónico de los CARs son generalmente fragmentos variables de anticuerpos monoclonales conectados por un *linker* peptídico corto o por puentes de disulfuro, conocidos como fragmento variable de cadena sencilla o scFv (del inglés *single-chain variable fragment*) (Glockshuber et al., 1990). Estos scFvs presentan 4 características críticas que afectan a los resultados clínicos: la afinidad, inmunogenicidad, especificidad y la estructura.

La afinidad de unión del CAR, así como sus niveles de expresión, determinan la eficacia de reconocimiento de antígenos tumorales. La afinidad del CAR debe de superar el límite para poder reconocer antígenos tumorales, pero no ser tan alta como para detonar efectos *on-target off tumor*, por lo que se puede ajustar en base a los niveles de

densidad antigénica de las células tumorales diana (Ramakrishna et al., 2019).

La mayoría de los CARs reconocen antígenos asociados a tumor (sobrexpresados en células tumorales, pero expresados en menor medida en tejido sanos), y no antígenos 100% específicos de tumor. Esto provoca toxicidad *on-target off-tumor* que puede provocar efectos secundarios severos y comprometer la eficacia terapéutica. Existen diversas estrategias que buscan controlar la eficacia y especificidad de las células CAR-T. Una estrategia explorada es diseñar CARs con dos scFvs, como los **tándem CARs** (TanCAR), **dual CARs**, **loop CARs**, **synNotch-CARs** y **CARs inhibitorios** (iCARs) (Han et al., 2019).

- Los **TanCAR** presentan dos scFvs conectados en serie fuera de la célula por un *linker* de glicina-serina. Al estar conectados en serie, cuando un scFv reconoce a un antígeno se activa el TanCAR, mientras que la activación de los dos scFvs producen efectos sinérgicos, aumentando la potencia.
- Los **dual CARs** expresan directamente dos CARs en una misma célula T, cada uno con su propia señalización independiente.
- Los **loop CARs**, al igual que los TanCARs, presentan dos scFvs en una misma molécula de CAR; a diferencia de los TanCARs (donde VL-VH de un scFv está conectado con VL-VH del otro scFv), los loop CARs no presentan los VL-VH conectados.
- Una estrategia diferente es la seguida por los **synNotch-CARs** en la cual, cuando el receptor synNotch reconoce un antígeno a través del dominio extracelular, se libera el dominio de activación transcripcional del receptor, que entra al núcleo y permite la expresión del CAR que reconoce a un segundo antígeno.
- En el caso de las células **iCAR-T**, estas presentan un CAR convencional frente a un antígeno diana, así como un iCAR, que

consiste en un scFv dirigido a un antígeno expresado en tejido sano, conteniendo un dominio de señalización inhibitorio, por lo que el doble reconocimiento de antígenos inhibe la acción citotóxica de las células CAR-T. Esto permite distinguir entre antígenos de expresión tumoral exclusiva y tejidos sanos.

Estos tipos de configuraciones han sido revisadas recientemente en (Mazinani & Rahbarizadeh, 2022).

A nivel de inmunogenicidad, la mayoría de CARs utilizados en estudios preclínicos y clínicos utilizan scFvs derivados de anticuerpos monoclonales murinos, lo que puede generar respuestas inmunitarias humorales y celulares que provoquen una eliminación prematura de las células CAR-T, incrementando el riesgo de recaídas (Khan et al., 2022). Para intentar solventar esto, se han desarrollado scFvs humanizados o completamente humanos para evitar las respuestas anti-CAR (Cao et al., 2018), así como aplicar regímenes de quimioterapia linfodeplectiva previa a la infusión de CAR-T (Gorovits & Koren, 2019).

Otro de los problemas de la terapia CAR-T derivado del uso de scFvs es que estos son propensos a la auto-agregación, provocando una activación y señalización vía CAR independiente de antígeno, lo que se conoce como señalización tónica (Calderon et al., 2020). Este proceso empuja a las células CAR-T a un estado de agotamiento funcional prematuro que limita su actividad antitumoral (Long et al., 2015). Una alternativa para evitar los problemas derivados del uso de scFvs pasa por el uso de nanoanticuerpos. Los **nanoanticuerpos** están formados por el dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada (VHH) que se encuentran naturalmente en el suero de los camélidos, siendo el fragmento más pequeño con capacidad de reconcomiendo antigénico. Estos presentan propiedades interesantes para su uso como

reconocedores de antígenos: tamaño pequeño (lo que permite una alta penetración), alta solubilidad, estabilidad y baja inmunogenicidad (Yang & Shah, 2020). Además, no presentan tendencia a la agregación, y pueden ser muy útiles en la aplicación a tumores sólidos, por su capacidad de alcanzar epítomos que difícilmente pueden alcanzar los scFvs convencionales (Hassani et al., 2019) (Mo et al., 2021). El sexto producto CAR-T aprobado por la FDA para su uso en pacientes con mieloma múltiple R/R (Carvykti) utiliza dos VHHs que se dirigen a dos epítomos diferentes de BCMA.

- ***Linker***

El *linker* es el elemento que permite el ensamblaje de las partes del scFv. El contenido y la longitud de éste tienen un papel no solo estructural, sino también funcional en la acción del CAR. Generalmente, se utilizan repeticiones de glicina-serina que aportan: 1) flexibilidad, para moldear la conformación de los sitios de unión a antígenos (Yan & Sun, 1997); 2) estabilidad en soluciones acuosas (Chen et al., 2013); 3) previene la formación de estructuras secundarias y 4) facilita el plegamiento (y, consecuentemente, la función) del scFv (van Rosmalen et al., 2017).

5.1.1.2. Región bisagra

El dominio bisagra actúa como elemento que sostiene al scFv y le aporta flexibilidad para acceder a los epítomos de los antígenos de las células diana (Moritz & Groner, 1995). Se sabe que el origen (generalmente derivado de componentes expresados en las células T), la flexibilidad y la composición de la bisagra influyen en la actividad antitumoral del CAR, pero múltiples estudios demuestran que la longitud de la bisagra y la distancia del antígeno de las células diana son determinantes en el reconocimiento efectivo del CAR.

Estos estudios indican que, por ejemplo, en el caso de CD19 (localizado distal a la membrana y expresado con una alta densidad), la modificación de la región bisagra no mejora la capacidad citotóxica de células CAR-T antiCD19, aunque sí su proliferación y capacidad de migración. Por otra parte, la incorporación de una región bisagra de una longitud adecuada permite reducir la distancia y disminuir el impedimento estérico para el acceso del scFv al epítipo de antígenos que residen proximales a la membrana de las células diana (Guest et al., 2005) (Qin et al., 2017).

5.1.2. Dominio transmembrana

El dominio transmembrana es un componente de la estructura del CAR anclado a la membrana que permite la unión de la región de reconocimiento antigénica con los dominios de señalización intracelulares. Deriva principalmente de CD3 ζ , CD4, CD8 α o CD28. Este dominio juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad de los niveles de expresión del CAR (Fujiwara et al., 2020), en la mediación de la dimerización del CAR e interacción con proteínas endógenas (Alabanza et al., 2017), así como en la producción de citoquinas, pues se ha comprobado que modificaciones en las regiones bisagra y transmembrana del CAR pueden modular la secreción de citoquinas y controlar toxicidades asociadas (Ying et al., 2019).

En esta dirección, un ejemplo de la importancia de la interacción intermodular del CAR fue descrito por Guedan y colaboradores, que demostraron que un CAR de tercera generación con los dominios coestimuladores ICOS y 4-1BB incrementaba su potencia antitumoral y persistencia *in vivo* solo cuando el dominio intracelular ICOS se colocó proximal a la membrana y fusionado directamente con el dominio transmembrana ICOS (Guedan et al., 2018). El dominio transmembrana

ICOS interacciona débilmente con Lck, lo que facilita el reclutamiento de p85 a ICOS, que deriva en la activación de PI3K. Cuando se introduce en un CAR, este dominio proporciona un *pool* extra de Lck, incrementando la señalización proximal (Wan et al., 2020).

5.1.3. Endodominio

El endodominio es la parte intracelular de la estructura del CAR que incluye los dominios coestimulatorios y los dominios de señalización o activación.

5.1.3.1. Dominio coestimulatorio

El dominio coestimulatorio mejor caracterizado en células T es CD28, que se expresa en todas las células T CD4 y en las CD8 con actividad citolítica (Ledbetter & Linsley, 1998) (Redmond et al., 2009). Cuando CD28 interacciona con sus ligandos CD80 y CD86, expresados en las células presentadoras de antígenos (van der Merwe et al., 1997), contribuye a la proliferación mediante el incremento de producción de IL-2 (Fraser et al., 1991), a la supervivencia (Boise et al., 1995) y a la actividad metabólica de las células T *naïve* (Frauwirth et al., 2002), regulando la actividad de NF- κ B, NFAT y AP-1 (Miller et al., 2009). Participa también en el reordenamiento del citoesqueleto, en la polimerización de actina y en la formación del complejo de la sinapsis inmunológica, induciendo la señalización vía TCR (Boomer & Green, 2010).

A finales de los 80 se descubrió que las células T activadas expresaban de manera inducible otra molécula coestimuladora, 4-1BB (CD137). Se comprobó que la expresión se inducía tras activación de la célula T y que no estaba restringida exclusivamente a este tipo celular (Vinay & Kwon, 2011). 4-1BB interacciona con su ligando, 4-1BBL, lo que estimula

la activación de las células T señalizando NF- κ B, c-Jun y p38 de manera independiente de CD28 (Cannons et al., 2001). Por otra parte, 4-1BB induce su expresión cuando la célula T se activa (Bagheri et al., 2020), favoreciendo la producción de citoquinas, actividad citotóxica e inhibiendo la AICD. Mientras que este dominio favorece las respuestas T CD4 y CD8 *in vitro*, aumenta la expansión clonal, la supervivencia y la respuesta T preferencialmente CD8 *in vivo*, suprimiendo la acción T CD4 (Vinay et al., 2006).

Aplicados a la construcción de CARs, clásicamente se ha considerado que 4-1BB promueve la persistencia prolongada de las células CAR-T, mientras que CD28 favorece una mayor potencia antitumoral en detrimento de la supervivencia celular prolongada. Y es que, aunque existen muchos otros dominios aplicados a CARs (ICOS, OX40, CD27, CD40, HVEM, GITR, MYD88/CD40...), la mayoría de ensayos clínicos hasta la fecha se han basado en el uso de CD28 o 4-1BB (Cappell & Kochenderfer, 2021). Aunque la eficiencia antitumoral de las células CAR-T con ambos dominios ha sido similar (principalmente frente a linfomas), los CD28-CARs presentan una mayor producción de citoquinas y una menor persistencia (Guedan et al., 2018) (Priceman et al., 2018). De hecho, la persistencia de los CD28-CARs fue similar a los CARs solo con CD3 ζ . Los 4-1BB-CARs incrementan la supervivencia a largo plazo de las células T, manteniendo una población circulante predominantemente memoria central, con un metabolismo fundamentalmente oxidativo (mientras que CD28 promueve la diferenciación a través de un metabolismo basado en glucólisis aeróbica) (Long et al., 2015).

El hecho de que las respuestas antitumorales prolongadas con CD28-CARs se vean alteradas puede deberse, en parte a la elevada señalización tónica dependiente de CD28 (debido a la redundancia en

la señalización de CD28 y CD3 ζ), que ocasiona un agotamiento prematuro. Recientemente, se ha conseguido reducir el agotamiento de células CD28-CAR-T anti-mesotelina interrumpiendo la interacción entre CD28 y el dominio SH2 de Grb2, alterando únicamente un aminoácido (Guedan et al., 2020). Junto a este estudio, datos de diversos estudios reportan la limitada persistencia de los CD28-CARs, aunque existen otros que indican una supervivencia prolongada cuando se dirige el CAR frente a CD19 (Lopez-Cantillo et al., 2022), por lo que parece estar claro que CD28 tiene un papel clave en la modulación de la persistencia de las células CAR-T *in vivo*.

En definitiva, cada dominio coestimulador detona una cascada de señalización que deriva en efectos funcionales diferentes, por lo que es fundamental seleccionar el adecuado, o una combinación de ellos, en base al tumor a tratar, para mejorar la traslación clínica de la terapia CAR-T.

5.1.3.2. Dominio de activación

En la estructura del CAR, el dominio de activación es crítico para detonar la señalización de las células T vía CAR. El dominio de activación más usado en células CAR-T es CD3 ζ (Sadelain et al., 2009), hecho que se ve reflejado en que todos los productos CAR-T aprobados por la FDA contienen este dominio.

En células T, la cantidad de motivos ITAM en el complejo TCR/CD3 favorecen la señalización. Sin embargo, en células CAR-T se ha demostrado que un solo motivo ITAM es suficiente y ventajoso para la actividad antitumoral de la célula en comparación con la incorporación de 2 o 3 motivos, pues la incorporación de más motivos ITAM resulta en una diferenciación acelerada y disminución de la persistencia (Feucht et al., 2019).

5.1.4. Evolución de las células CAR-T

La combinación de los diferentes elementos para generar distintos CARs a lo largo de 3 décadas ha permitido agrupar a los CARs en 5 generaciones. La **primera generación** contenía exclusivamente el dominio intracelular CD3 ζ , pero se observó un efecto citotóxico y proliferación muy reducida, debido a la falta de coestimulación (C. Zhang et al., 2017). La **segunda generación** (la más usada hoy en día, pues los 6 medicamentos CAR-T aprobados por la FDA son de segunda generación) incorpora un solo dominio coestimulador con el objetivo de potenciar la proliferación y citotoxicidad de las células T (Finney et al., 1998). La **tercera generación** incorpora dos dominios coestimuladores, aunque no ha podido mostrar una mejora clara en eficacia antitumoral con respecto a la segunda generación. Efectivamente, hay estudios donde la potencia antitumoral aumenta (Hombach et al., 2013), y otros en los que se ve reducida (Zhao et al., 2015). La **cuarta generación** se basa en la utilización de CARs de segunda generación, incluyendo la expresión constitutiva o inducible de una proteína inmunomoduladora, como pueden ser citoquinas (IL-12, IL-15, IL-18 o IL-21), quimioquinas o anticuerpos secretables. Estos CARs armados se conocen como TRUCKs (del inglés *T cells redirected for unrestricted cytokine-initiated killing*) y están aportando algunos resultados impresionantes cuando se aplican a linfomas agresivos y a tumores sólidos, incluso en fases avanzadas. Esto es debido a que la liberación de moléculas inmunomoduladoras permiten la actuación sinérgica de las células CAR-T junto otras células del sistema inmunitario en la eliminación tumoral por varias vías: citólisis mediada por granzimas y perforinas, IFN γ y TNF α o Fas-FasL y TRAIL. Además, no actúan solo a nivel del tumor, sino también sobre el TME, favoreciendo el acceso al núcleo tumoral (revisado en (Chmielewski &

Abken, 2015) y en (Tokarew et al., 2019)). Recientemente se está explorando la **quinta generación**: se toma como base los CARs de segunda generación, pero conteniendo un dominio citoplasmático truncado de la cadena β del receptor de IL-2, con un sitio de unión al factor de transcripción STAT3. Cuando la célula T se activa, se detonan las 3 señalizaciones necesarias para una respuesta fisiológica completa, que son 1) activación del TCR a través de CD3 ζ ; 2) señalización por el dominio coestimulador; y 3) señalización de citoquinas a través de JAK-STAT3/5 (Kagoya et al., 2018) (**Fig. 5B**).

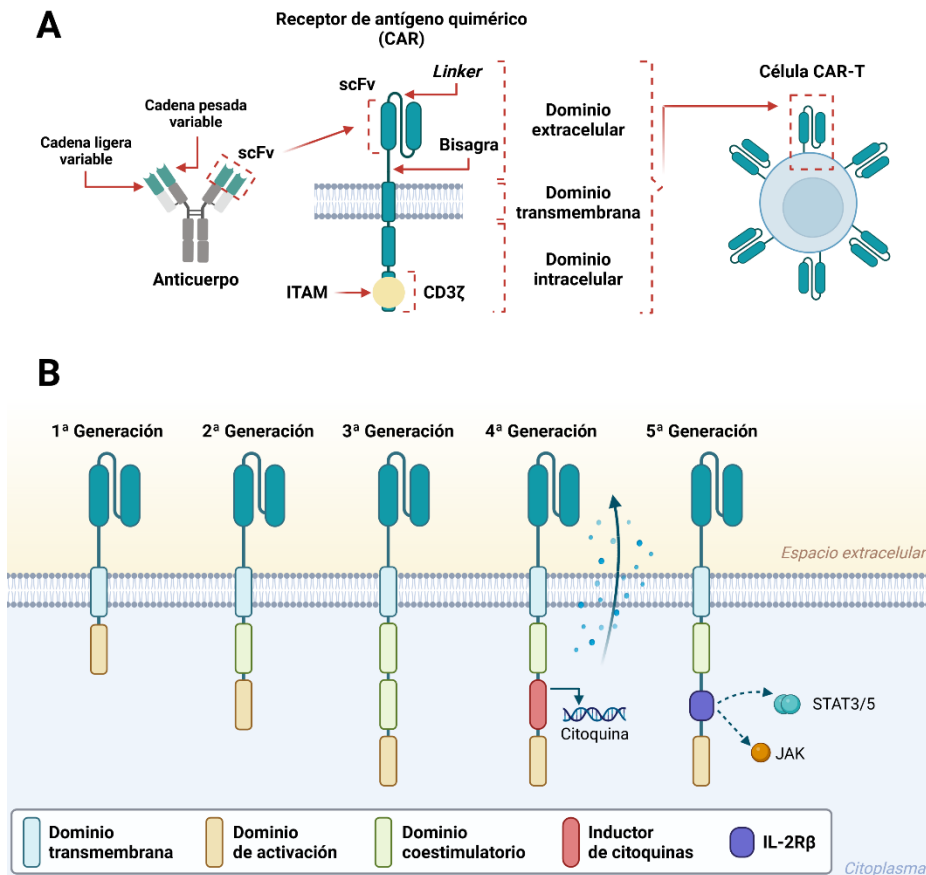


Figura 5. Estructura de un receptor de antígeno quimérico (CAR) y generaciones de CARs desarrolladas.

A) Estructura de un CAR, formado por un dominio extracelular (que contiene un dominio de reconocimiento derivado de un anticuerpo monoclonal (scFv),

unido por un *linker*; un dominio transmembrana, que se une al dominio extracelular por una región bisagra; un dominio intracelular, que permite la transducción celular cuando el CAR reconoce a un antígeno. **B)** Generaciones de CARs desarrolladas, que varía en su región intracelular: la 1ª contiene un dominio de activación; la 2ª un dominio de activación junto a un dominio coestimulador; la 3ª contiene, además, un segundo dominio coestimulador; la 4ª contiene un *cassette* para la coexpresión de una molécula inmunomoduladora; y la 5ª contiene IL-2R β . Tanto la 4ª como la 5ª parten de un CAR de segunda generación. *Creada con BioRender.com.*

CAR: receptor de antígeno quimérico (del inglés *chimeric antigen receptor*); scFv: anticuerpo de cadena sencilla (del inglés *single-chain variable fragment*); ITAM: motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).

5.2. Manufactura de las células CAR-T

El proceso de manufactura de los productos CAR-T implica la obtención de los linfocitos del paciente mediante aféresis, la modificación genética *ex vivo*, la expansión de las células y la reinfusión en el paciente. Es un proceso complejo, multifactorial y largo, lo que supone un inconveniente para el futuro uso en cantidades mayores de pacientes (Abou-El-Enain et al., 2021). En esta sección repasaremos las barreras del proceso de manufactura, así como algunas propuestas para solventarlas.

Barrera 1: vectores virales. La mayoría de ensayos clínicos e investigación preclínica utilizan vectores virales (y particularmente lentivirales) para la expresión del CAR en las células T. Sin embargo, la dificultad para obtener *stocks* con un alto título, así como la toxicidad intrínseca de la proteína CAR en las células empaquetadoras, pueden suponer un retraso crítico en el tiempo de manufactura.

En este sentido, algunas alternativas útiles para solventar estas dificultades pueden ser: 1) realizar modificaciones de las células empaquetadoras de VLs para generar líneas más resistentes, que deriven en mayores títulos virales (W. Zhang et al., 2017) (Han et al.,

2021); 2) utilización de promotores específicos del linaje celular T para expresar el CAR, evitando la expresión del CAR en las células empaquetadoras y la toxicidad asociada, pero asegurando la expresión del CAR en células T (Colamartino et al., 2019).

Los VLs presentan una capacidad de carga limitado, que en el caso de los TRUCKs puede llegar a ser inviable. El uso de transposones de ADN puede aportar un mayor cargo para la entrega de genes, aunque se debe de reducir la toxicidad asociada a la electroporación de ADN para poder mejorar las eficacias de transducción, aspecto que se ha logrado mejorar mucho con la incorporación de la tecnología de los minicírculos.

Barrera 2: tiempo de manufactura. Otra de las limitaciones de la terapia CAR-T convencional son los dilatados tiempos de manufactura. Por ejemplo, el proceso de manufactura de Kymriah y Yescarta es de 22 y 17 días respectivamente (sin contar el tiempo de aprobación de la infusión por parte de las autoridades competentes, transporte e infusión post-manufactura), lo que puede ser demasiado tiempo para un paciente con cáncer en una fase muy avanzada.

Recientemente, se han explorado procedimientos para reducir notablemente los tiempos de manufactura. La plataforma MASTER (del inglés *Multifunctional Alginate Scaffold for T Cell Engineering and Release*) integra los procesos de activación, modificación y amplificación *in vivo*, reduciendo el tiempo de manufactura a 1 día, dando resultados superiores en modelos animales de linfoma a CAR-T generados de manera convencional (Agarwalla et al., 2022). Otro de los métodos explorados se basa en la generación de células CAR-T no activadas en 24 horas, mostrando de nuevo actividad anti-leucémica superior *in vivo* (Ghassemi et al., 2022). Otros procesos de manufactura

de tiempos reducidos son las plataformas FasTCAR (C. Zhang et al., 2022), desarrollada por Gracell Biotechnologies, y T-Charge (NCT03960840) de Novartis, que reducen a 1 día el tiempo total de manufactura.

Estas aproximaciones suponen una mejora de la actividad citotóxica por la mejora de fenotipo obtenida, pues el cultivo *ex vivo* de las células deriva en un inicio de diferenciación de las células T para su crecimiento, lo que disminuye la calidad del producto de infusión (Asmamaw Dejenie et al., 2022). Sin embargo, se deben de realizar un mayor número de estudios de eficacia y seguridad para la aplicación y estandarización clínica de estos protocolos.

Barrera 3: coste. Una de las barreras actuales más limitantes de la terapia CAR-T es el elevado coste por paciente, que limita considerablemente el acceso a la terapia, y que imposibilita que se estandarice para un uso masivo de pacientes cuando el coste es asumido por sistemas sanitarios públicos (Arnaudo, 2022). Existen diversas estrategias para intentar reducir costes, como son el uso de transposones de ADN en lugar de vectores virales (Singh et al., 2022), la reducción de los tiempos de manufactura o la aplicación de CARs académicos de fabricación local, que permitirían disminuir tanto el tiempo de manufactura como el coste por paciente (Trias et al., 2022).

6. Terapia CAR-T para el tratamiento de neoplasias hematológicas

La terapia CAR-T ha supuesto un avance sin precedentes en el tratamiento de neoplasias hematológicas refractarias o en recaída. Esto ha llevado a la aprobación de diversos productos por la FDA y EMA procedentes de los centenares de ensayos clínicos basados en modificación genética de células T con CARs. Sin embargo, pese a los resultados obtenidos, la terapia presenta efectos secundarios que pueden llegar a ser severos, y aún afronta una serie de limitaciones.

6.1. Dianas para la terapia CAR-T frente a neoplasias hematológicas

Los antígenos a los que se dirigen los CARs cuando se tratan neoplasias hematológicas se concentran en CD19, BCMA, CD20 y CD22, aunque también se han explorado otros como CD23, CD30, CD33, SLAMF, ROR1 o CD138, entre otros.

El antígeno más ampliamente atacado en neoplasias B ha sido CD19. CD19 es un miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas, expresado exclusivamente en el linaje celular B. Se expresa desde las células pro-B en médula ósea hasta los plasmablastos en periferia, pasando por todos los estadios de desarrollo, y actúa como co-receptor de la señalización del BCR (Li et al., 2017). Además, para el tratamiento del HL se ha puesto la diana en CD30 (Gruss et al., 1994), CD33 para leucemia mieloide aguda (Walter et al., 2012) y SLAMF, CD138 y principalmente BCMA para mieloma múltiple (Lu & Jiang, 2022).

Actualmente, los 6 productos CAR-T aprobados se dirigen frente a CD19 (4) y frente a BCMA (2) (**Fig. 6**).

6.2. Productos CAR-T aprobados frente a neoplasias hematológicas

6.2.1. Kymriah (Tisagenlecleucel)

Kymriah (CTL019, CD19/FMC63) utiliza un CAR formado por el scFv con el clon FMC63 (dirigido frente a CD19) unido al dominio coestimulador 4-1BB a través del dominio transmembrana CD8 α , y con CD3 ζ como dominio de señalización que se expresa bajo el promotor EF1 α (**Fig. 6A**). Kymriah se genera a partir de PMBCs modificados con un VL de envuelta VSV-G que codifica para el CAR.

Kymriah fue aprobado por la FDA el 31 de agosto de 2017 para el tratamiento de pacientes menores de 25 años con B-LLA refractaria o en segunda o posterior recaída, siendo así el primer producto CAR-T aprobado y comercializado (Maude et al., 2018). El 2 de mayo de 2018, se aprobó su uso para tratar varios NHL R/R, en base a los resultados del ensayo clínico fase II JULIET (NCT02445248) (111 pacientes tratados, (tasa de respuesta general (ORR, del inglés *Overall Response Rate*) 52%, remisión completa (CR, del inglés *complete remission*) 40%, CRS e ICANS detectados). El 27 de mayo de 2022 se aprobó el uso de Kymriah para el tratamiento de linfoma folicular R/R posterior a dos o más líneas de tratamiento sistémico, en base a los resultados del ensayo clínico fase II ELARA (NCT03568461) (97 pacientes tratados, ORR 86%, CR 66%, se detectó CRS e ICANS), constituyendo la tercera indicación de Kymriah.

Cabe destacar un incidente ocurrido con un paciente tratado con Kymriah, en el que se transdujeron accidentalmente células B tumorales y comenzaron a expresar el CAR. Este hecho aumentó la resistencia a la terapia, consecuencia del enmascaramiento de CD19 tumoral ocurrido por el reconocimiento de las células CAR-B, que impedía el

acceso de las células CAR-T a parte de las células tumorales, lo que derivó en una recaída post CR y muerte del paciente 8 meses después de la infusión (Ruella et al., 2018).

6.2.2. Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel)

Yescarta (KTE-X19, CD19/FMC63) se genera con γ RVs que lleva un CAR α CD19 que utiliza el mismo scFv y el mismo dominio de señalización que Kymriah, pero contiene CD28 como dominio coestimulador, además de incorporar el dominio transmembrana del mismo CD28. En este caso, el CAR se expresa bajo el promotor viral MSCV y utiliza una envuelta diferente, GaLV (**Fig. 6B**).

Yescarta fue aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con diferentes NHL tras 2 o más líneas de terapia sistémica el 18 de octubre de 2017, en base a los resultados del ensayo clínico fase I/II ZUMA-1 (NCT02348216) (101 pacientes infundidos, ORR 83%, CR 58%, con aparición de CRS e ICANS). El 3 de marzo de 2021, fue aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma folicular R/R en base a los resultados del ensayo clínico ZUMA-5 (NCT03105336) (104 pacientes infundidos, ORR 92%, CR 74%). Además, los resultados recientes tan favorables del ensayo ZUMA-12 (NCT03761056) han permitido establecer a Yescarta como primera línea de tratamiento para pacientes con DLBCL agresivo quimiorrefractario (Neelapu et al., 2022).

En junio de 2021, Yescarta fue aprobado en China bajo el nombre de Yikaida (FKC876), convirtiéndose en el primer producto CAR-T en ser aprobado en este país.

6.2.3. Tecartus (Brexucabtagene Autoleucel)

Tecartus (CD19/FMC63) presenta los mismos elementos estructurales que Yescarta (**Fig. 6C**).

Es el tercer producto CAR-T, aprobado para el tratamiento de linfoma de células de manto R/R en pacientes adultos el día 24 de julio de 2020. Esta aprobación surge sobre la base de los resultados del ensayo clínico fase II ZUMA-2 (NCT02601313) (ORR 93%, CR 67%, con incidencia de ICANS). Además, el 1 de octubre de 2021, la FDA aprobó el uso de Tecartus para el tratamiento de B-LLA R/R en adultos, en base a los resultados del ensayo fase II ZUMA-3 (NCT02614066) (55 pacientes infundidos, CR 71%, observándose CRS e ICANS).

En términos de manufactura, Tecartus presenta algunas diferencias frente a Yescarta, que incluyen la selección de células T (incluye la eliminación de células tumorales en el material extraído de la leucoaféresis, así como una selección de las células CD4 y CD8), lo que puede minimizar los fallos en la producción (Mian & Hill, 2021).

Tecartus ha mostrado resultados superiores (tanto en ORR como en CR) a su predecesor Yescarta, aunque la incidencia de CRS e ICANS ha sido mayor, por lo que sigue siendo necesaria una mejora en el control de las toxicidades asociadas (Lu & Jiang, 2022).

6.2.4. Breyanzi (Lisocabtagene Maraleucel)

Breyanzi (CD19/FMC63) presenta el mismo scFv que los 3 CARs anteriores, junto a CD3z y 4-1BB como dominios intracelulares, unidos mediante el dominio transmembrana CD28 (**Fig. 6D**).

Breyanzi fue aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes adultos con diversos NHL R/R tras 2 o más líneas de tratamiento sistémico, el día 5 de febrero de 2021, en base a los resultados del ensayo TRANSCEND NHL 001 (NCT02631044) (256 pacientes infundidos, ORR 73%, CR 53%, con incidencia de CRS e ICANS). Además, los resultados del ensayo fase II PILOT (NCT03483103) y del ensayo

fase III TRANSFORM (NCT03575351) llevaron a la FDA a aprobar el uso de Breyanzi para pacientes con DLBCL R/R después de una única línea de tratamiento el día 25 de junio de 2022.

Breyanzi presenta un elemento estructural diferencial comparado con otros CARs aprobados, y es que con expresa junto al CAR un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (tEGFR, del inglés *truncated epidermal growth factor receptor*) que no es funcional, pero que permite la delección de las células CAR-T en caso de toxicidad, o para facilitar la detección de las células CAR-T (Ogasawara et al., 2021).

En el proceso de manufactura, se seleccionan las células T CD4+ y CD8+ del producto de aféresis y se activan, transducen y expanden de manera independiente, para ser reinfundidas en un *ratio* 1:1. El uso de dosis con ratios fijos mejora la persistencia, la proliferación y reduce las respuestas tóxicas asociadas a la sobreactivación de las células CAR-T (Abramson et al., 2020).

6.2.5. Abecma (Idecabtagene Vicleucel)

Abecma (bb2121, BCMA/C11D5.3) presenta la misma estructura que Kymriah (dominios intracelulares y transmembrana), con un scFv basado en el clon C11D5.3 cuya expresión está controlada por un promotor sintético MND (**Fig. 6E**).

Es el primer producto CAR-T aprobado por la FDA (26 de marzo de 2021) dirigido a un antígeno diferente de CD19, en este caso frente a BCMA. Este producto ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con MM R/R tras 4 o más líneas de tratamiento. La aprobación se sostiene en base a los resultados del ensayo clínico fase II KARMMA (NCT03361748) (ORR 73%, CR 33%, aparición de ICANS) (Munshi et al., 2021). El ensayo posterior CRB-401 (NCT02658929) demostró la

eficacia y seguridad del uso de Abecma también en pacientes con MM R/R severamente tratados (62 pacientes infundidos, ORR 76%, CR 39%).

6.2.6. Carvykti (Ciltacabtagene Autoleucel)

Carvykti (BCMA/VHH-VHH) presenta la misma estructura que el CAR anterior, pero con una particularidad única con respecto a todos los CARs aprobados, y es que no presenta un scFv convencional, sino dos dominios VHH (nanoanticuerpos) dirigidos frente a dos epítomos diferentes de BCMA. Su expresión en el VL está controlada por el promotor EF1 α (**Fig. 6F**).

Carvykti es la segunda terapia CAR-T aprobada a nivel mundial dirigiéndose a BCMA (28 de febrero de 2022), aplicada para el uso de MM avanzado R/R tras 3 o más líneas de tratamiento previas (Berdeja et al., 2021). La aprobación se basa en los resultados del ensayo clínico fase I/II CARTITUDE-1 (NCT03548207) (ORR 97,9%). De manera preliminar (debido al poco tiempo transcurrido tras infusión a día de hoy), los resultados de Carvykti parecen ser más prometedores incluso que los de Abecma (Usmani et al., 2022).

Todos los datos clínicos asociados a estos 6 productos CAR-T aprobados se resumen en la **Tabla 2**.

6.2.7. Otros productos CAR-T

A parte de los productos CAR-T aprobados por la FDA y por la EMA, existen diversos productos aprobados por determinadas agencias regulatorias con regímenes de aplicación especiales. Uno de ellos es **Relmacabtagene Autoleucel** (Relma-cel, JWCAR029, CD19/FMC63). Relma-cel es un producto CAR α CD19 para el tratamiento de DLBCL como segunda línea, producido, comercializado y aprobado exclusivamente en China, que surgió como consecuencia de los

problemas de exportación de material biológico de China para la aplicación de los CAR-T comerciales. La estructura es la misma que la de Breyanzi (CD19/4-1BB/CD3 ζ + tEGFR). El proceso de manufactura implica una diferencia con el de Breyanzi, y es que se infunde el producto sin una proporción fija CD4:CD8. Los datos del ensayo clínico fase II NCT04089215 demostraron que Relma-cel presenta una eficacia comparable con Breyanzi con una toxicidad mesurada, cuando se aplica a la misma indicación (Ying et al., 2021).

Otro producto CAR-T autólogo, **KITE-222** (antiCLL1), recibió en septiembre de 2022 la designación de medicamento huérfano para el tratamiento de leucemia mieloide aguda R/R, cuya eficacia y seguridad se está evaluando en un ensayo clínico fase I (NCT04789408).

Un caso único en el mundo es el del CAR académico **ARI-0001 (Varnimcabtogene Autoleucel)**. ARI-0001 es un CAR α CD19 (clon de desarrollo propio A3B1/4-1BB/CD3 ζ) desarrollado íntegramente en el Hospital Clínic (Barcelona) y aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para el tratamiento de pacientes mayores de 25 años con B-LLA (Castella et al., 2019) (Castella et al., 2020), siendo hasta octubre de 2021, con la aprobación de Tecartus, el único producto CAR-T a nivel mundial aplicado a pacientes adultos con B-LLA R/R. La aplicación se realiza bajo régimen de exención hospitalaria (EH), un mecanismo que permite la aplicación de la terapia más allá de los ensayos clínicos, sin necesidad de datos tan avanzados como los medicamentos comerciales (Sanchez-Guijo et al., 2023). Sin embargo, la EH se circunscribe a cada hospital, por lo que cada centro infusor tendrá que solicitarla (Trias et al., 2022). Recientemente, ARI-0001 recibió la designación *PRiority MEDicine* (PRIME) por parte de la EMA, para la aceleración del desarrollo de la terapia ([EMA - listado de medicamentos PRIME](#), 01/02/2023).

Como se ha comprobado en el ensayo clínico CART19-BE-01 (NCT03144583), cuando se aplican las células ARI-0001, los resultados son comparables a los obtenidos cuando se aplican los productos comerciales aprobados. Inicialmente, los eventos de CRS supusieron la muerte de algunos pacientes, sin embargo, mediante el fraccionamiento en 3 dosis (10%, 30% y 60%), los efectos secundarios se han visto drásticamente reducidos, manteniendo la potencia antitumoral (Ortiz-Maldonado et al., 2021).

Más allá de los resultados, la aplicación de ARI-0001 puede suponer un caso disruptivo en la generación de células CAR-T por dos motivos críticos: 1) ARI-0001 constituye el primer CAR de desarrollo completamente académico aprobado por una agencia reguladora a nivel mundial. Esto se traduce en un coste de 89.270€ por paciente, muy inferior a los 307.200€ y 327.000€ que asume el Sistema Nacional de Salud español por Kymriah y Yescarta, respectivamente; 2) el proceso de manufactura *in-house* de las células ARI-0001 permite reducir drásticamente los tiempos de manufactura de los productos comerciales. Ambos escenarios se pueden traducir en que una mayor cantidad de pacientes tengan acceso a la terapia (Barros et al., 2022).

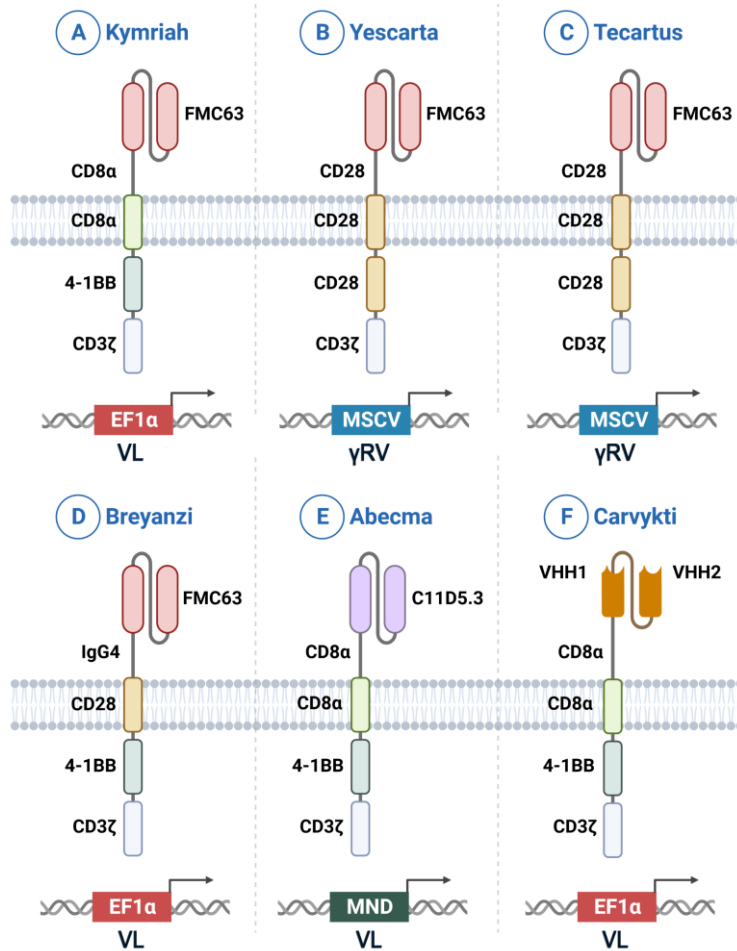


Figura 6. Estructura de los seis productos CAR aprobados por la FDA/EMA, y promotores que permiten su expresión.

A) Kymriah (Tisagenlecleucel); **B)** Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel); **C)** Tecartus (Brexucabtagene Autoleucel); **D)** Breyanzi (Lisocabtagene Maraleucel); **E)** Abecma (Idecabtagene Vicleucel); **F)** Carvykti (Ciltacabtagene Autoleucel). *Creada con BioRender.com.*

VL: vector lentiviral; γRV: vector gamma retroviral.

Tabla 2. Información relativa a los productos CAR-T aprobados por la FDA/EMA.

	Kymriah		Yescarta		Tecartus	
Diana/Clon	CD19/FMC63	CD19/FMC63	CD19/FMC63	CD19/FMC63	CD19/FMC63	CD19/FMC63
Dominio coestimulatorio	4-1BB		CD-28	CD-28	CD-28	
Dominio de señalización	CD3ζ		CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ	
Fase	Fase 2	Fase 2	Fase 1/2	Fase 3	Fase 2	Fase 2
Dosis	3.1x10 ⁸ células	0.6-6x10 ⁸ células	2x10 ⁶ células	2x10 ⁶ células	2x10 ⁶ células	1x10 ⁶ células
Indicaciones incluidas	DLBCL TFL	FL	DLBCL TFL PMBCL	FL MZL	MCL	B-ALL
Pacientes infundidos	111 (90)	97 (94)	108 (101)	170 (170)	68 (60)	55 (55)
Condicionamiento	FLU 25 mg/m ²			FLU 30 mg/m ²	FLU 30 mg/m ²	FLI 25 mg/m ²
Quimioterapia	CY 250 mg/m ²			CY 500 mg/m ²	CY 500 mg/m ²	CY 900 mg/m ²
ORR	52%	86%	83%	83%	93%	NR
CR	40%	66%	58%	65%	67%	71%
CRS (3-4)	22%	0%	11%	6%	15%	24%
ICANS (3-4)	12%	1%	32%	21%	31%	25%
Ensayo clínico	JULIET (NCT0244 5248)	ELARA (NCT0356 8461)	ZUMA-1 (NCT0234 8216)	ZUMA-5 (NCT03105 336)	ZUMA-2 (NCT02601313)	ZUMA-3 (NCT02614066)

	Breyanzi	Abecma	Carvykti
Diana/Clon	CD19/FMC63	BCMA/CD11D5.3	BCMA/VHH-VHH
Domino coestimuladorio	4-1BB	4-1BB	4-1BB
Domino de señalización	CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ
Fase	Fase 1	Fase 2	Fase 1
Dosis	Nivel1: 50x10 ⁶ células Nivel2: 100x10 ⁶ células Nivel3: 150x10 ⁶ células	Nivel1: 150x10 ⁶ células Nivel2: 300x10 ⁶ células Nivel3: 450x10 ⁶ células	Fase 1b/2 0.75x10 ⁶ células
Indicaciones incluidas	LBCL, MCL (después de 2 líneas)	MM	MM
Pacientes incluidos	268 (255)	128 (128)	97 (97)
Condicionamiento	FLU 30 mg/m ²	FLU 30 mg/m ²	FLU 30 mg/m ²
Quimioterapia	CY 300 mg/m ²	CY 300 mg/m ²	CY 300 mg/m ²
ORR	73%	73%	97.9
CR	53%	33%	82.5%
CRS (3-4)	2%	5%	2 pacientes
ICANS (3-4)	10%	3%	NR
Ensayo clínico	TRANSCEND NHL 001 (NCT02631044)	KARMMA (NCT03361748)	CARTITUDE-1 (NCT03548207)

6.3. Efectos secundarios asociados

Pese a los resultados sin precedentes de las células CAR-T tratando síndromes linfoproliferativos, la terapia no está exenta de efectos secundarios, así como de ciertas limitaciones:

6.3.1. Síndrome de liberación de citoquinas

El síndrome de liberación de citoquinas (CRS, del inglés *cytokine release syndrome*) es una respuesta inflamatoria sistémica inespecífica asociada a la expansión de las células CAR-T, siendo una de las complicaciones más frecuentes asociada a la terapia. Se detona por una liberación masiva de moléculas inmunomoduladoras tras el encuentro del CAR con el antígeno, como IL-6, IL6R soluble, IL-2Ra soluble, IFN γ o GM-CSF. Además, es frecuente la activación co-lateral (efecto *bystander*) de monocitos, que incluye un incremento de los niveles de IL-8 e IL-10, entre otros (Teachey et al., 2016).

El CRS ocurre entre el 30-94% de pacientes de 1-22 días tras la infusión, con una mediana de 2-3 días (Neelapu et al., 2022). El tratamiento pasa por el uso de Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a IL-6R soluble y anclado a la membrana, junto a esteroides para CRS de alto grado. Sin embargo, en el caso del CRS resistente (caracterizado por la no mejora clínica tras el uso de Tocilizumab + esteroides), la tasa de mortalidad es muy alta. Existe evidencia que indica que la severidad del CRS está relacionada con la cantidad de tumor, la terapia linfodeplectiva utilizada, la dosis de CAR-T infundida o la cinética de proliferación de las células CAR-T (Davila et al., 2014). Cabe destacar que el CRS puede evolucionar en síndrome de activación de macrófagos como una de las complicaciones más graves y potencialmente mortal (Yang et al., 2019).

6.3.2. Síndrome de neurotoxicidad asociado a células inmuno-efectoras

El síndrome de neurotoxicidad asociado a células inmuno-efectoras (comúnmente neurotoxicidad, ICANS, del inglés *immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*) es otra de las complicaciones comunes y, en este caso, exclusivas de la terapia CAR-T. Ocurre en el 67% de pacientes con leucemia y en el 62% de pacientes con linfoma, generalmente 3 semanas tras la infusión.

Inicialmente, la aparición de ICANS se asociaba con la expresión de CD19 en sectores del sistema nervioso central, idea que se desechó tras observar casos de ICANS en células CAR-T dirigidas frente a CD22 y BCMA. Sin embargo, sí parece haber consenso en dos cosas: 1) ICANS parece ser mayoritario en el tratamiento de tumores hematológicos, siendo prácticamente inexistente cuando se tratan tumores sólidos; 2) la infiltración de células CAR-T en el sistema nervioso central parece no correlacionarse con la aparición de ICANS. Un posible mecanismo de aparición de ICANS puede deberse al incremento de IL-1 derivada de monocitos, niveles altos de IL-6 y de GM-CSF en el líquido cefalorraquídeo.

El tratamiento pasa por el uso de corticosteroides y, aunque varios marcadores son compartidos con el CRS, paradójicamente el tratamiento con Tocilizumab empeora los síntomas del ICANS. Este efecto adverso asociado a la terapia CAR-T ha sido ampliamente revisado en (Siegler & Kenderian, 2020).

6.3.3. Aplasia de células B y citopenias

La terapia CAR-T dirigida contra células B, como en la terapia α CD19, deriva en una situación de hipogammaglobulinemia completa. Este

efecto *on-target off-tumor* es esperado, consecuencia de que las células CAR-T α CD19 convencionales no pueden discriminar entre CD19 presentado por células B sanas o tumorales (Bonifant et al., 2016). De hecho, paradójicamente, la aplasia de células B prolongada es una medida de funcionalidad de la terapia, pues indica de manera indirecta la presencia de células CAR-T α CD19 (Porter et al., 2015).

La pérdida de células B sanas en pacientes con tumores CD19+ no es una condición indispensable para la supervivencia, pues la terapia de reemplazo de inmunoglobulinas administrada de manera periódica permite suplir la ausencia de células B sanas (Wat & Barmettler, 2022). Sin embargo, se han reportado citopenias de grado >3 y neutropenias severas en 20-30% de los pacientes tratados con Kymriah y Yescarta, que requieren de tratamientos profilácticos antifúngicos, antivirales, antibacterianos, así como administración de G-CSF y transfusiones de sangre (Yanez et al., 2019).

Otros efectos secundarios incluyen el síndrome de lisis tumoral, observado en mayor frecuencia en pacientes que no han recibido un régimen de condicionamiento previo, y posibles reacciones de inmunogenicidad y anafilaxia en caso de reinfusión de varias dosis de CAR-T (Maus et al. 2014).

6.4. Resistencia y recaída de la terapia CAR-T

Existen determinados factores que afectan a la eficacia de las células CAR-T y que pueden ocasionar un fallo en la terapia como, por ejemplo, el fenotipo de las células CAR-T infundidas, en el que incluye el mantenimiento de estadios T no tan diferenciados para minimizar la disfuncionalidad de las células (Turtle et al., 2016). De hecho, las recaídas son frecuentes, y precisamente las **recaídas antígeno positivas** responden a una falta de persistencia por: 1) sobreactivación

de las células CAR-T por el reconocimiento antigénico continuo; 2) una elevada señalización tónica del CAR que deriva en un agotamiento prematuro; o 3) por la presión ejercida por el sistema inmunitario del huésped que lleva a la eliminación de las células CAR-T (Gu et al., 2022).

Pese a ser menos frecuentes, la elevada presión ejercida por las células CAR-T puede llevar a **recaídas antígeno negativas**. En el caso de B-LLA tratados con CAR-T α CD19, el 14% de los pacientes presentan recaídas CD19- (Yang et al., 2019).

Otro de los mecanismos de resistencia o escape es una pérdida transitoria de antígeno por **trogocitosis**. En este proceso, el antígeno diana se transfiere a las células T ocasionando un doble escape: por una parte, se produce una disminución de la densidad antigénica en el tumor, disminuyendo la actividad de las células CAR-T; por otra parte, favorece el fratricidio entre las células CAR-T (Hamieh et al., 2019).

7. Terapia CAR-T para el tratamiento de tumores sólidos

El funcionamiento y los resultados sin precedentes generados por la terapia CAR-T frente a cánceres líquidos no se ha visto reflejado a día de hoy en el tratamiento de tumores sólidos. Estos tipos tumorales presentan sin duda varias complejidades extra, pues la dificultad en la elección de la diana, elevada heterogeneidad intratumoral, la escasa capacidad de infiltración tumoral o la inhibición citolítica mediada por el TME constituye un reto mayúsculo en el éxito clínico de la terapia. Sin embargo, se están llevando a cabo diversos abordajes con el objetivo de mejorar la potencia de la terapia, para poder trasladar los resultados obtenidos en leucemias, linfomas y mieloma a tumores sólidos.

7.1. Dianas para la terapia CAR-T frente a tumores sólidos

Debido a la amplia variedad de tumores sólidos, se han elegido diversos antígenos para redirigir a las células CAR-T, algunos específicos de ciertos tumores, y otros comunes. Sin embargo, existen ciertas diferencias con respecto a la elección de antígenos en comparación con la terapia frente a neoplasias B: en general, la heterogeneidad antigénica es mucho mayor en tumores sólidos que en cánceres líquidos; la densidad antigénica es, generalmente, menor en comparación con neoplasias líquidas; finalmente, muchos antígenos a los que se dirigen las células se expresan en tejidos vitales, aunque en menores concentraciones (Safarzadeh Kozani et al., 2022).

En este sentido, algunos estudios han demostrado que la baja densidad antigénica es un factor importante en la eficacia de la terapia y en la posibilidad de recaídas, como Anurathapan y colaboradores, que comprobaron esto en cáncer de páncreas y próstata a nivel preclínico

(Anurathapan et al., 2014). Además, O'Rourke y colaboradores observaron en un ensayo clínico frente a glioblastoma que el uso de CAR-T α EGFRvIII ocasionó una disminución de la densidad antigénica (comprobando que las biopsias obtenidas cuando se habían infundido CAR-T presentaban niveles antigénicos menores que las obtenidas previa infusión), lo que derivó en el fallo de la terapia (O'Rourke et al., 2017).

En cuanto a la elección del antígeno diana, es imprescindible evaluar la toxicidad *on-target off-tumor*, pues el reconocimiento de tejidos sanos por las células CAR-T puede ser mortal, como en el caso reportado por Morgan y colaboradores, donde un paciente infundido con células CAR-T α HER2 murió 5 días post-infusión, consecuencia del reconocimiento de tejido pulmonar sano HER2+, que sumado a una fuerte tormenta de citoquinas, llevó a un colapso pulmonar (Morgan et al., 2010). Sin embargo, se han realizado avances enormes en la seguridad de la terapia, como el uso de CARs múltiples, mecanismos de seguridad (EGFRt, genes suicidas...) o generación de TRUCKs inducibles, así como una continua búsqueda de antígenos exclusivos de tumores sólidos.

En la **Tabla 3** se incluyen los antígenos de diferentes tumores sólidos más utilizados para la redirección de las células CAR-T en ensayos clínicos.

7.2. Ensayos clínicos de células CAR-T frente a tumores sólidos

Actualmente, se encuentran aproximadamente 230 ensayos clínicos registrados en [ClinicalTrials](#) en los que se aplican CAR-T para el tratamiento de tumores sólidos.

Los antígenos diana más frecuentes son mesotelina, GPC3, CEA, MUC1, HER2 y EGFR. Todos estos antígenos son comunes a varios tipos de cáncer, por lo que existen múltiples ensayos clínicos con cada uno de ellos. La mayoría de los ensayos reclutan a pacientes con glioma, cáncer de páncreas y cáncer de pulmón, aunque otros como cáncer de mama y cáncer de próstata también están presentes. La mayoría de ellos se encuentran en fase I, y tratan de evaluar persistencia, seguridad y eficacia de las células CAR-T.

La gran mayoría de los ensayos utilizan CARs dirigidos frente a una única diana, con 13 y 9 estudios dirigiendo el CAR a 2 o más dianas respectivamente. La mayoría utilizan CARs de segunda generación con 4-1BB, aunque también encontramos un número considerable de ensayos con CARs de tercera y cuarta generación. Estas estrategias surgen como alternativas interesantes para intentar compensar los resultados clínicos moderados obtenidos hasta ahora, lo que se ve reflejado en el hecho de no existir aún ningún producto CAR-T aprobado para el tratamiento de tumores sólidos.

Esta información ha sido detallada recientemente en (Barros et al., 2022) y en (Asmamaw Dejenie et al., 2022).

7.3. Limitaciones de la terapia CAR-T en el tratamiento de tumores sólidos

Aplicadas a tumores sólidos, las células CAR-T se enfrentan a varias barreras que comprometen la eficacia de la terapia. Estas barreras son dependientes del tipo de tumor, del momento de desarrollo y de la firma molecular (**Fig. 7**).

7.3.1. Heterogeneidad intratumoral

Una de las complicaciones asociadas a la redirección de células CAR-T frente a tumores sólidos es la baja homogeneidad en la expresión de antígenos, como se ha explicado anteriormente. Los distintos niveles de expresión de antígenos en las diferentes regiones tumorales pueden debilitar la función de las células, porque la elevada diversidad antigénica en células malignas (que en muchos casos es compartida con tejidos sanos) dificulta la identificación de antígenos específicos tumorales (E. Zhang et al., 2018).

Para sobrepasar esto, una de las estrategias se ha basado en dirigir las células a varios antígenos asociados a tumor (TAAs, del inglés *tumor associated antigens*) simultáneamente (con las estrategias de CARs duales explicados en secciones previas). Otra de las estrategias consiste en dirigir al CAR a marcadores de células madre cancerígenas, pues esta población celular genera la elevada heterogeneidad tumoral, por lo que podría ser un método indirecto para combatirla. El uso de CARs frente a CD133 (Dai et al., 2020) (Wang et al., 2018) (Bueno et al., 2019) o CD44v6, una isoforma de CD44 (Porcellini et al., 2020) (Haist et al., 2021) está bajo evaluación, como consecuencia de que son marcadores de células *stem* expresados en varios tumores sólidos.

7.3.2. Tráfico e infiltración en el tejido tumoral

Otra de las razones por la que la terapia CAR-T ha presentado una eficacia notablemente menor en tumores sólidos es porque las células CAR-T tienen dificultades para entrar al tejido tumoral a través del endotelio vascular, debido a los diferentes mecanismos de inhibición de factores vasculares que detonan los tumores sólidos (Salmon et al., 2012). Entre ellos, los tejidos tumorales suprimen la expresión de ICAM-1, evitando que las células T se extravasen de los vasos sanguíneos y

evitando la entrada al tumor (Vedvyas et al., 2019). Otro mecanismo se basa en la inhibición de la expresión de múltiples quimioquinas, que presentan un papel quimioatractivo fundamental para las células T, que sumado al entorno fibrótico extratumoral, reduce la capacidad de migración e invasión hacia el tumor por las CAR-T (Li et al., 2018).

Para abordar esta problemática, una alternativa propuesta es sustituir la administración intravenosa por administración regional de las células CAR-T en aquellos casos donde el acceso al tumor esté más restringido. La administración intracraneal para el tratamiento de glioblastoma (Brown et al., 2016) o la administración de CAR-T embebidas en fibrina en pacientes con tumores sólidos con resecciones incompletas (Uslu et al., 2023) han demostrado ser seguras y presentar una actividad antitumoral aceptable.

Otra estrategia consiste en mejorar la quimiotaxis de las células CAR-T hacia el tumor, modificando las células CAR-T para expresar receptores de quimioquinas específicos de ciertos tipos tumorales (Whilding et al., 2019), o usando virus oncolíticos. Uno de los ejemplos con el uso de estos ha sido la terapia combinada de células CAR-T (que expresan de manera natural receptores de quimioquinas comunes como CCR1, CCR3 y CCR5) con virus oncolíticos para que las células tumorales expresen CCR5, lo que ha generado resultados prometedores a nivel preclínico (Nishio et al., 2014).

7.3.3. Microambiente tumoral inmunosupresor

A diferencia de la mayoría de neoplasias hematológicas que carecen de rutas de supresión inmunológica locales, los tumores sólidos suelen presentar una elevada infiltración de diversas células inmunológicas que favorecen el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (Hanahan & Coussens, 2012) (Rodríguez-García et al., 2020). Los tipos

tumorales presentes en el TME se han desarrollado en secciones previas.

Existen diversas estrategias bajo estudio para intentar sobrepasar las limitaciones impuestas por el TME, sin embargo, todas parecen confluir en la idea de que es imprescindible atacar a las células inmunosupresoras del TME para una terapia CAR-T efectiva (Kankeu Fonkoua et al., 2022). Por otra parte, estrategias enfocadas a la dirección del CAR frente a elementos estructurales del TME (Bughda et al., 2021) (Martin-Otal et al., 2022), así como la secreción de factores que degraden componentes de la matriz extracelular (Caruana et al., 2015) o citoquinas moduladoras del TME (se desarrollará posteriormente) parecen ser la clave para alcanzar resultados terapéuticos en tumores sólidos.

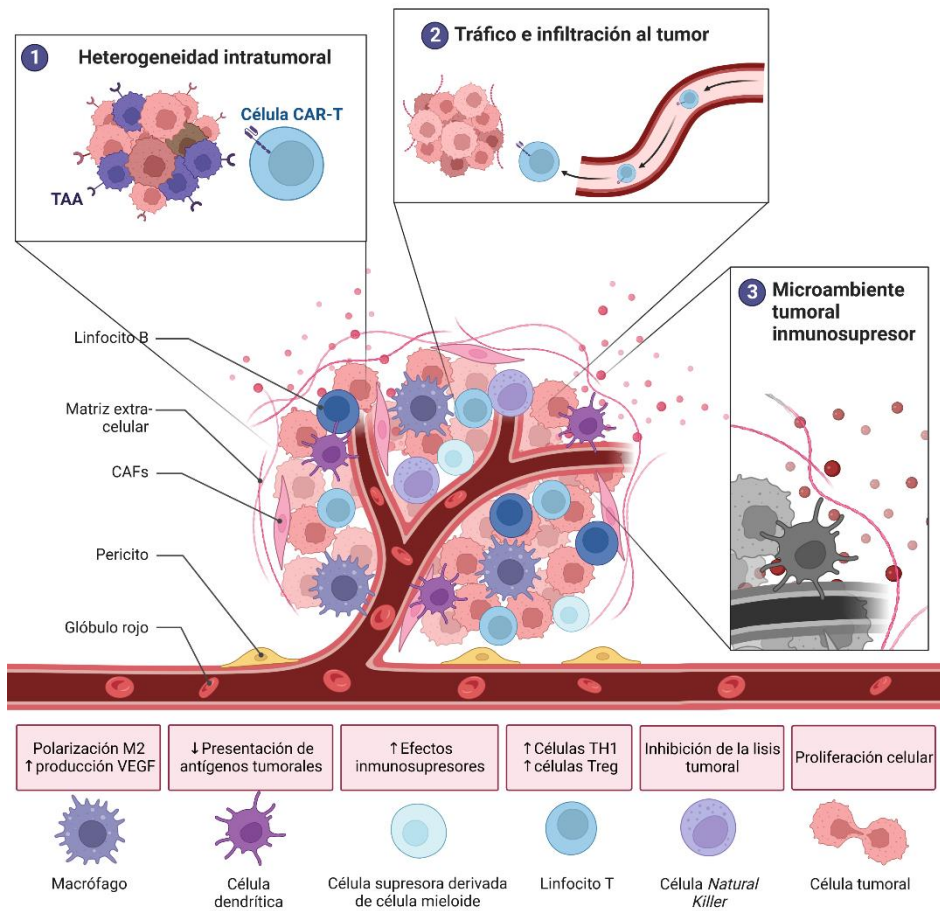


Figura 7. Principales limitaciones de la terapia CAR-T en el tratamiento de tumores sólidos.

Las células CAR-T se enfrentan a 3 principales limitaciones cuando se enfrentan a tumores sólidos: 1) Una elevada heterogeneidad intratumoral; 2) Dificultad en el tráfico e infiltración al núcleo tumoral; y 3) Un microambiente altamente inmunosupresor. Abajo se muestran las principales células inmunitarias presentes en el microambiente tumoral, y la función que desempeñan. *Creada con BioRender.com.*

TAA: antígeno asociado a tumor (del inglés *tumor associated antigen*); CAFs: fibroblastos asociados a cáncer (del inglés *cancer-associated fibroblasts*); VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *vascular endothelial growth factor*).

Tabla 3. Ensayos clínicos de células CAR-T dirigidas a los principales antígenos de tumores sólidos.

Antígeno	Cáncer	Fase	ID
EGFR	Pulmón, hígado, estómago	Fase 1/2	NCT03179007, NCT03525782
HER2	SNC	Fase 1	NCT03500991
EGFR806	SNC	Fase 1	NCT03179012
Mesotelina	Ovario, cervical, páncreas, pulmón	Fase 1/2	NCT01583686
PSCA	Pulmón	Fase 1	NCT03198052
MUC1	Pulmón	Fase 1/2	NCT03179007, NCT03525782
Claudina 18.2	Estómago	Fase 1	NCT03874897
EpCAM	Colon, páncreas, próstata, gástrico, hígado	Fase 1/2	NCT03013712
GD2	SNC	Fase 1	NCT04099797
VEGFR2	Melanoma, SNC	Fase 1	NCT01218867
AFP	Hígado	Fase 1	NCT03349255
Nectina4/FAP	Nectina4+	Fase 1	NCT03932565
CEA	Pulmón, colorrectal, gástrico, mama, páncreas	Fase 1	NCT02349724
Lewis Y	Lewis Y+	Fase 1	NCT03851146
Glipican-3	Hígado	Fase 1	NCT02932956
EGFRIII	SNC	Fase 1	NCT01454596
IL-13R α 2	SNC	Fase 1	NCT02208362
CD171	Neuroblastoma	Fase 1	NCT02311621
MUC16	Ovario	Fase 1	NCT02311621
PSMA	Próstata	Fase 1	NCT01140373
AFP	Hígado	Fase 1	NCT03349255
AXL	Renal	Fase 1	NCT03393936
CD20	Melanoma	Fase 1	NCT03893019
CD80/86	Pulmón	Fase 1	NCT03198052
c-Met	Mama, hígado	Fase 1	NCT03060356, NCT03638206
DLL-3	Pulmón	Fase 1	NCT03392064
DR5	Hígado	Fase 1	NCT03638206
EpHA2	SNC	Fase 1	NCT02575261
FR- α	Ovario	Fase 1	NCT00019136
gp100	Melanoma	Fase 1	NCT03649529
MAGE-A1/3/4	Pulmón	Fase 1	NCT03356808, NCT03535246
LMP1	Nasofaríngeo	Fase 1	NCT02980315

8. Estrategias para la mejora de la eficacia y seguridad de las células CAR-T

Durante este manuscrito se han remarcado los resultados sobresalientes de la terapia CAR-T tratando cánceres líquidos, así como los resultados mucho más comedidos tratando tumores sólidos. Sin embargo, en ambos casos, la terapia sigue presentado limitaciones para mejorar no solo la eficacia, sino también su seguridad.

8.1. Regulación de la expresión del CAR

Como hemos comentado al inicio de este capítulo, se han realizado esfuerzos intensos en la modificación de diversas partes de la arquitectura del CAR con el objetivo de mejorar las propiedades de las células CAR-T. Sin embargo, otro parámetro menos estudiado, pero de elevada importancia, es la densidad del CAR en la membrana, así como el control de la expresión del mismo.

La región U3 del 5'LTR de los VLS presenta secuencias *enhancer*/promotoras endógenas, que han sido eliminadas en los vectores autoinactivados, por lo que es el promotor interno quien determina la expresión del CAR. La elección de un promotor adecuado es fundamental para una terapia CAR-T exitosa. El promotor del factor de elongación 1 α (EF1 α , del inglés *elongation factor 1 α*) es el más comúnmente aplicado para la expresión de CARs en células T, debido a que es un promotor fuerte que permite una expresión estable del CAR en células T. Sin embargo, se ha comprobado que la expresión permanente con una densidad alta propia de promotores fuertes puede derivar en un proceso de señalización tónica y sobreactivación de la célula T, que acabe provocando un agotamiento prematuro y un fallo de la terapia, ocasionando recaídas (Mazinani & Rahbarizadeh, 2022).

Un estudio pionero en demostrar esto fue el realizado por Eyquem y colaboradores, que insertaron de manera dirigida con CRISPR-Cas9 y vectores adenoasociados (AAVs, del inglés *adenoassociated vectors*) un CAR α CD19 en el locus TRAC (del inglés *T cell receptor alpha chain*). Comprobaron que, tras estimulación, el CAR seguía la cinética de expresión del TCR endógeno (internalización rápida tras encuentro antigénico y recuperación posterior de los niveles basales), lo cual confirió a las células CAR-T una mayor potencia antitumoral, reduciéndose la señalización tónica, marcadores de agotamiento y manteniendo un fenotipo menos diferenciado (Eyquem et al., 2017).

Posteriormente, y en la misma línea, Weber y colaboradores demostraron que la incorporación de regímenes de “descanso transiente” en la señalización del CAR confería a las células CAR-T una actividad antitumoral superior, e incluso permitía el rescate funcional de células T parcial o totalmente agotadas. Se aplicó dasatinib (un inhibidor de tirosín quinasa que inhibe reversiblemente las quinasas esenciales para la señalización proximal del CAR, como método de “descanso”) sobre células CAR-T con marcas funcionales, fenotípicas, transcriptómicas y epigenéticas de agotamiento, así como con una elevada señalización tónica, consiguiéndose restaurar la actividad antitumoral y derivando en un fenotipo memoria (Weber et al., 2021).

Pese a que existe consenso en que una expresión elevada y continua del CAR en membrana deriva en una señalización tónica que perjudica la acción antitumoral, estos estudios dilucidaron la importancia del control de la expresión (y, consecuentemente, señalización) del CAR.

Como una aproximación clínicamente más cercana, nuestro grupo ha generado células CAR-T bajo el control del promotor quimérico AW, que permite una cinética similar a la del TCR sin la necesidad de usar

herramientas de edición genómica. Nuestros resultados, en línea con los dos trabajos comentados, demostraron una mejora en el fenotipo, disminución de marcadores de agotamiento, disminución de señalización tónica y menores niveles de liberación de citoquinas proinflamatorias con respecto a células EF1 α -CAR-T, sin comprometer la eficacia antitumoral (Tristán-Manzano et al., 2022).

En este trabajo se pone de manifiesto que, junto a una expresión fisiológica, una menor densidad de CAR en la membrana puede ser beneficioso para la terapia CAR-T α CD19, hecho respaldado también por el trabajo de Ho y colaboradores, que utilizan otro promotor (MND19) para obtener células CAR-T con menor densidad. Observaron que un menor número de moléculas de CAR en la membrana deriva en una mayor actividad antitumoral (Ho et al., 2021). Resultados similares fueron obtenidos por Gomez-Silva y colaboradores utilizando CARs-41BB comparando la expresión por un promotor viral LTR vs el promotor EF1 α , con una menor expresión (Gomes-Silva et al., 2017).

Finalmente, este hecho parece no ser exclusivo de células CAR-T α CD19, pues Rodriguez-Marquez y colaboradores demostraron que una menor densidad de CAR en células CAR-T α BCMA no solo deriva en un fenotipo menos agotado, menor señalización tónica y una menor producción de citoquinas proinflamatorias, sino que se correlaciona con una mejor evolución clínica en pacientes con mieloma múltiple con respecto a células con una mayor densidad de CAR (Rodriguez-Marquez et al., 2022).

Sin embargo, como hemos comentado, las células CAR-T son productos heterogéneos, y muchos factores (tanto intrínsecos como extrínsecos) pueden influir en su funcionalidad. La compleja arquitectura del CAR, y la interacción entre todos los componentes

pueden provocar respuestas diferentes en distintas situaciones. Guedan y colaboradores observaron que un CAR frente a mesotelina, PGK300-BBz (con menor densidad), presentó una actividad antitumoral notablemente más baja que un CAR con una mayor densidad (EF1 α -BBz) (Guedan et al., 2018), algo similar a lo observado por Walker y colaboradores (Walker et al., 2017). Esto nos indica la complejidad de la interacción CAR – antígeno, la heterogeneidad en base al modelo tumoral utilizado a la hora de alcanzar un umbral que detone la actividad citotóxica de las células T, así como la diferencia de eficacia en base a los componentes que arman los distintos dominios del CAR y a su interacción.

8.2. Desarrollo de células TRUCK

Como hemos comentado a lo largo de las distintas secciones, el abordaje del tratamiento de tumores sólidos mediante la terapia CAR-T ha resultado ineficiente. Parece claro que armar a las células CAR-T generando células CAR-T de 4ª generación o TRUCKs puede facilitar la aplicación de la terapia frente a tumores sólidos, pues el hecho de ser capaz de estimular a células inmunorreguladoras a la vez que incrementamos las propiedades de las células CAR-T puede arrojar luz a la consecución de resultados relevantes para el abordaje de tumores sólidos.

8.2.1. TRUCKs de expresión constitutiva

La generación de TRUCKs con expresión constitutiva de citoquinas se ha llevado a cabo o bien mediante la co-transducción con dos VLs, o mediante la transducción con un vector que incluye un elemento que permita expresar varios genes bajo un mismo promotor (como un péptido de autoescisión 2A o un elemento IRES). Se han explorado diferentes citoquinas para la coexpresión en células T, como citoquinas

de cadena gamma común (IL-2, IL-15, IL-7 e IL-21), citoquinas de la familia de interleuquina 12 (principalmente IL-12) y citoquinas de la súper familia de la interleuquina 1 (IL-36 e IL-18).

- **Interleuquina 2**

La interleuquina IL-2 es la citoquina por excelencia en la activación de las células T. Promueve la proliferación de células inmunológicas y la producción de proteínas anti-apoptóticas, actuando sobre Tregs y células T activadas CD4 y CD8, así como células NK en menor medida. Los primeros intentos en el uso de IL-2 a nivel clínico fue la administración directa de IL-2 en monoterapia o en combinación con TILs. Los resultados antitumorales fueron significativos, pero se asociaron a una toxicidad elevada en altas dosis (Atkins et al., 2000).

Se generaron células CAR-T α CD19 de primera generación para que liberaran IL-2 constitutivamente, lo que mejoró la supervivencia de ratones con linfoma diseminado en comparación con células CAR-T convencionales, aunque otras citoquinas de cadena gamma común se asociaron con mayores supervivencias y una persistencia prolongada (Markley & Sadelain, 2010). Sin embargo, la elección de IL-2 se vio detenida prematuramente debido al efecto en proliferación de las Tregs, lo que inhibe las respuestas antitumorales, aparte de promover la AICD y la diferenciación terminal de células T, lo que está asociado con respuestas antitumorales poco duraderas (Gattinoni et al., 2005).

- **Interleuquina 15**

La interleuquina IL-15 es una citoquina proinflamatoria que posee una estructura y función biológica similar a la IL-2. En este caso, es secretada mayoritariamente por los fagocitos. Actúa principalmente sobre células T CD8 y células NK (Hamid et al., 2006). Al igual que con

IL-2, la administración directa de IL-15 se ha asociado con una elevada toxicidad (Miller et al., 2018) (Conlon et al., 2019).

La coexpresión constitutiva de IL-15 mejoró la actividad antitumoral de células CAR-T frente a CD19 (Hoyos et al., 2010), GPC-3 (Batra et al., 2020), CLL-1 (Ataca Atila et al., 2020), GD2 (Chen et al., 2019) e IL-13R α 2 (Krenciute et al., 2017). La generación de células CAR-T α CD19.IL15 incrementó su persistencia con respecto a otras citoquinas, y permitió el mantenimiento de un fenotipo memoria, asociado con respuestas antitumorales sostenidas en pacientes tratados con CAR-T (Fraiatta, Lacey, et al., 2018). De manera alternativa, se ha explorado la expresión de IL-15 anclada a la membrana en lugar de secretable, lo que permite el efecto autocrino sobre las células CAR-T incrementando su supervivencia, pero limitando el efecto paracrino (Hurton et al., 2016). Esta aproximación se está evaluando en un ensayo clínico fase I (NCT03579888). Además, también se están desarrollando estrategias para coexpresar esta citoquina junto a su receptor, IL15R (Stoklasek et al., 2006) (Y. Zhang et al., 2022)

Además de la modificación genética de células CAR-T, se han modificado genéticamente células NKT para expresar IL-15. Estas células secretoras de IL-15 consiguieron mantener una población memoria central con menor tendencia al agotamiento y apoptosis, lo que se tradujo en un incremento de la actividad antitumoral *in vivo*. Además, puede ser particularmente relevante para el tratamiento de tumores sólidos, pues la IL-15 protegió a las células CAR NKT del ambiente hipóxico del TME (Xu et al., 2019). Esto se está evaluando en pacientes pediátricos con neuroblastoma (NCT03294954).

- **Interleuquina 7**

Esta citoquina secretada por células no hematopoyéticas ejerce un papel fundamental en el sistema inmunitario adaptativo, crucial para la linfopoyesis y homeostasis de células T y B (Lorenzo, 2016). La administración directa de IL-7 en pacientes promueve la expansión de células T CD4 y CD8, así como incrementa la diversidad de repertorios de TCRs, permitiendo la expansión preferencial de células T *naïve*, lo que puede mejorar la respuesta antitumoral (Sportes et al., 2008).

La administración subcutánea de IL-7 incrementó el efecto terapéutico de manera dosis-dependiente, sin mostrar una toxicidad severa en comparación con IL-2 o IL-15 (Sportes et al., 2010). La modificación genética de células CAR-T α GD2 para expresar constitutivamente IL-7 permitió la eliminación de células tumorales en presencia de Tregs (Perna et al., 2014), lo cual puede aportar una ventaja funcional en tumores con ambientes altamente inmunosupresores. Cuando se generaron células CAR-T CD19.IL7, la potencia antitumoral fue superior en comparación con IL-2 o IL-15, pero la persistencia a largo plazo fue menor que en el caso de CAR-T CD19.IL-15 (Markley & Sadelain, 2010). Además, la expresión de IL-7 mejoró la actividad de células CAR-T α CD20 y mesotelina, pero exclusivamente cuando se coexpresaban junto a CCL19 (Adachi et al., 2018). La expresión de ambos incrementó la infiltración tumoral de células CAR-T, de células T endógenas y de células dendríticas, lo que permitió el mantenimiento de un fenotipo memoria y un incremento de la quimiotaxis, que finalmente se tradujo en una regresión de tumores avanzados. La eficacia y seguridad de estas células multi-modificadas están siendo evaluadas en ensayos clínicos frente a linfoma (NCT03929107, NCT04381741), mieloma múltiple (NCT03778346) y tumores sólidos (NCT03198546, NCT03932565).

La principal limitación de esta aproximación es que la señalización continua de IL-7 provoca la regulación a la baja de IL-7R α (Park et al., 2004). Para restaurar la respuesta de IL-7, se ha propuesto la coexpresión de IL-7R α , pero parece ser que la interacción prolongada de células T.IL7R α con IL-7 puede promover la apoptosis por la sobreexpresión del eje Fas-FasL inducida por IFN γ (Kimura et al., 2013).

- **Interleuquina 21**

IL-21 activa preferencialmente la ruta de STAT3 sobre STAT5, a diferencia de otras citoquinas de cadena gamma común, favoreciendo también la proliferación mediante la señalización a través de PI3K y MAPK (Zeng et al., 2007).

Las células CAR-T expresando IL-21 transgénica mejoraron la supervivencia en comparación con células CAR-T expresando IL-2, IL-7 o IL-15. Un mecanismo posible para explicar esto puede ser por el efecto de IL-21 en el mantenimiento de poblaciones memoria, lo que permite la persistencia a largo plazo, algo que se correlaciona con la reducción de la diferenciación terminal de células T CD8 efectoras que comprobaron (Moroz et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo y eficacia de estas células TRUCK sigue bajo estudio.

- **Interleuquina 12**

IL-12 favorece la activación de células T específicas de tumor y la diferenciación a fenotipos pro-inflamatorios. La administración sistémica de IL-12, pese a haber supuesto una eficacia moderada, ha presentado toxicidad en pacientes (Leonard et al., 1997).

La modificación genética de células CAR-T para liberar IL-12 ha sido intensamente explorada no solo por el efecto sobre las células T, sino también sobre el resto de células del sistema inmunológico, como

células NK, dendríticas y MDSCs. Un estudio basado en la generación de células CAR-T α MUC16 para secretar IL-12 supuso un incremento en supervivencia de ratones a través del incremento de la producción de IFN γ y el incremento de persistencia *in vivo* (Koneru et al., 2015). Sin embargo, diferentes estudios han mostrado resultados susceptibles a debate, pues parece no estar claro si la actividad antitumoral está mediada por los efectos de la IL-12 liberada por las células CAR-T, o por las células IL-12R+ del huésped (Kerker et al., 2011). De cualquier modo, un ensayo clínico con células CAR-T.MUC16.IL12 está en progreso (NCT02498912).

- **Interleuquina 36**

IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ son miembros de la súper familia de IL-1 descubiertos recientemente. Estas citoquinas han sido poco estudiadas, pero presentan potencial para mejorar la terapia celular adoptiva. Por ejemplo, IL-36 γ ha mostrado capacidad para remodelar el TME, así como mediar la potencia de la respuesta T CD8 (Wang et al., 2015).

Se han realizado aproximaciones en la generación de células CAR-T para coexpresar IL-36 γ , mejorando la expansión y persistencia de las células CAR-T, lo que ha provocado una actividad antitumoral potenciada. Este efecto depende de la señalización autocrina mediada por MyD88, aunque IL-36R se expresa también en otros tipos celulares inmunitarios. La interacción de la citoquina con su receptor incrementa la expresión de MHC-II y CD86 en macrófagos y células dendríticas, sugiriendo que IL-36 tiene un papel importante en la presentación antigénica (Li et al., 2021). Esto abre la puerta a la aplicación de células CAR-T.IL36 para el tratamiento de tumores sólidos en recaídas antígeno

negativas, aunque los estudios relacionados con esta citoquina aún están en fase temprana.

- **Interleuquina 18**

IL-18 es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos, células dendríticas y células epiteliales principalmente, que interacciona con el receptor heterodimérico IL-18R α – IL18R β expresado por células NK y por células T. Pese a que el mecanismo no está claro, IL-18 parece tener un papel dual pues, por una parte, parece presentar funciones protumorigénicas, como el incremento de la angiogénesis, metástasis y proliferación tumoral (Kang et al., 2009), mientras que, por otra parte, se ha comprobado que presenta actividad antitumoral en cooperación con la respuesta Th1 (Tsutsui et al., 1996). Esto se ha visto apoyado porque induce la producción de IFN γ y de moléculas citotóxicas efectoras por los linfocitos T Th1 y CD8, activando a células NK, macrófagos y otros tipos inmunitarios, coordinando una potente respuesta antitumoral (Hoshino et al., 1999). Por otra parte, la señalización de IL-18 sin otras citoquinas inflamatorias potencia respuestas Th2 (Yoshimoto et al., 2000).

La administración sistémica en monoterapia de IL-18 fue bien tolerada, pero no mostró beneficio para pacientes con melanoma metastásico (Robertson et al., 2008). Sin embargo, la modificación genética de células CAR-T/TCR-T humanas y murinas para expresar IL-18 mejoró la proliferación, producción de citoquinas y actividad antitumoral, lo cual se ha comprobado en varios estudios: uno de ellos demostró el incremento de expansión de células CAR-T CD8 por la acción de la IL-18 secretada por células CAR-T CD4 (Hu et al., 2017); otro estudio demostró que la IL-18 incrementa una población de células T Bet^{high} FoxO1^{low} cuando se estimulan vía CAR, generándose una situación de

inflamación aguda que favorece la acción antitumoral (Chmielewski & Abken, 2017).

Los resultados preclínicos tan positivos de las células CAR-T CD19.IL-18 han llevado a investigadores de la Universidad de Pensilvania a un ensayo clínico fase I para el tratamiento de diversos linfomas CD19+ refractarios incluso a una o varias terapias CAR-T previas (NCT04684563).

Pese a los efectos beneficiosos de la coexpresión de IL-18 en células CAR-T, una posible limitación puede darse por la interacción de la citoquina con la proteína de unión de IL-18 (IL-18BP, del inglés *IL-18 binding protein*), un punto de control inmunitario recientemente descrito que inhibe la señalización de IL-18 (Zhou et al., 2020). Sin embargo, hay dos estrategias bajo estudio para solventar esto: 1) desarrollo de una IL-18 resistente a IL-18BP; 2) el desarrollo de receptores quiméricos, que detonen la señalización de IL-18 por la unión de otra citoquina (Lange et al., 2021).

Además, otros receptores tanto naturales como artificiales han sido propuestos para ser coexpresados en células CAR-T, como el receptor natural de IL-7 (Shum et al., 2017), o los receptores artificiales IL-4/IL-7 (Bajgain et al., 2018) o IL-4/IL-2 (Wilkie et al., 2010).

8.2.2. TRUCKs de expresión inducible

Las células TRUCK secretoras de citoquinas han logrado reducciones tumorales sustanciales en determinados tipos de tumores sólidos que clásicamente no han respondido a la terapia CAR-T convencional. Sin embargo, las citoquinas que han producido resultados más remarcables (IL-15, IL-12 e IL-18) han generado una toxicidad base derivada de la potencia producida: IL-15 e IL-12 presentaron toxicidad

elevada administradas sistémicamente, mientras que el perfil de IL-18 fue más moderado, pero el hecho de detonar la producción de IFN γ y generar un ambiente de inflamación aguda permanente puede ocasionar potenciales riesgos sistémicos, por lo que se han realizado intentos de controlar la expresión de estas citoquinas.

- **Interleuquina 15**

La proliferación descontrolada y la toxicidad sobre las células CAR-T asociada a la expresión de IL-15 transgénica ha llevado al desarrollo de sistemas de seguridad para el control de la citoquina. Se han realizado diversos estudios preclínicos coexpresando caspasa 9 inducible (iC9, del inglés *inducible caspase 9*) junto a IL-15, una proteína que, cuando dimeriza por un inductor químico, inicia la muerte inducida por apoptosis. Basado en los buenos resultados preclínicos que indican la rápida eliminación de las células CAR-T (Di Stasi et al., 2011), se están iniciando ensayos clínicos combinando IL-15 con iC9 (NCT03721068). También se encuentra en fase clínica temprana la misma estrategia aplicada sobre células NK (NCT03579927).

- **Interleuquina 12**

La expresión constitutiva de IL-12 por células T modificadas genéticamente no solo ha derivado en una elevada toxicidad, sino también en una aceleración del agotamiento celular (Yang et al., 2012). Esto ha llevado a la generación de células TRUCK inducibles, que expresen IL-12 de manera regulada. Para ello, el mecanismo canónico empleado se basa en la utilización del promotor NFAT (del inglés *nuclear factor of activated T cell*), un promotor que permite la activación del transgén cuando la célula T se activa (**Fig. 9, izquierda**). Este mecanismo ha permitido reducir la toxicidad sistémica asociada a una expresión continua de IL-12 sin comprometer la actividad antitumoral a

nivel preclínico (Zhang et al., 2011). Sin embargo, el promotor NFAT no permite una liberación de la citoquina específica cuando el CAR reconoce a su antígeno, sino cuando la célula T se activa, por lo que procesos de activación independientes del reconocimiento antigénico del CAR (expansión, exposición a citoquinas, reconocimiento vía TCR o señalización tónica del CAR) detonarán una liberación inespecífica de la citoquina. Esto se ha comprobado en un ensayo clínico, donde se infundieron TILs.NFAT.IL12, y se comprobó que el promotor NFAT no era suficiente para restringir la producción de IL-12 exclusivamente al momento de entrada de los TILs al tumor (Zhang et al., 2015). De hecho, posteriormente esto fue respaldado por Alsaieedi y colaboradores, que comprobaron que las células TCR-T.NFAT.IL12 causaron una toxicidad letal *in vivo* (Alsaieedi et al., 2019).

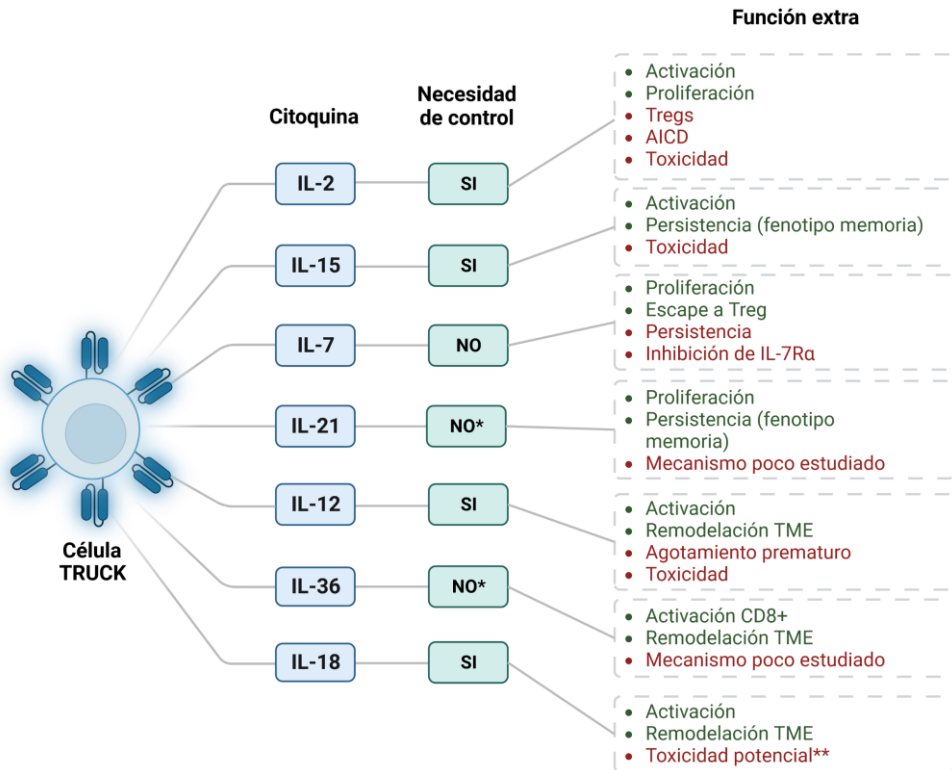
Pese a los resultados observados, diversos estudios preclínicos han mostrado la eficacia del uso de células CAR-T.NFAT.IL12, y su alta capacidad de remodelación del TME, lo que ha llevado a la evaluación de su seguridad y eficacia en ensayos clínicos frente a tumores sólidos (NCT03542799).

Como alternativa, Alsaieedi y colaboradores propusieron la utilización de un sistema expresión inducible por doxiciclina para controlar la expresión de la citoquina (Alsaieedi et al., 2019). Para ello usaron el vector retroviral pSERS, un vector Tet-On *all-in-one*, con el que indujeron temporalmente IL-12, que permitió la inhibición del crecimiento de un tumor de melanoma B16F10 exclusivamente en presencia de doxiciclina, mientras que no se detectó toxicidad en ausencia de inductor. Además, durante la ventana de exposición a doxiciclina y liberación de IL-12, observaron un incremento en el número de TILs asociado a un aumento de PD-1 y un incremento de células dendríticas en el TME.

- **Interleuquina 18**

Se han realizado con IL-18 estudios muy similares a los seguidos con IL-12 controlando la expresión con el promotor NFAT, con el objetivo de limitar los efectos secundarios sistémicos asociados a una expresión constitutiva. Se han obtenido resultados remarcables en modelos murinos singénicos, donde se ha observado que la expresión de IL-18 es capaz de remodelar el TME, incrementando el número células T CD8, células NK y células presentadoras de antígenos, lo que ha derivado en una inducción de respuestas T específicas de tumor (Avanzi et al., 2018). La remodelación del TME mediada por IL-18 es extensa, pues en otro estudio se observó una reducción de células dendríticas inmunosupresoras, junto a una reducción de macrófagos protumorales M2 y células Tregs (Chmielewski & Abken, 2017). Esta estrategia ha supuesto un incremento en eficacia terapéutica *in vivo* en modelos de leucemia CD19+ (Hu et al., 2017), modelos de tumores pulmonares y pancreáticos avanzados (Chmielewski & Abken, 2017) y tumores GD2+ primarios (Zimmermann et al., 2020), mostrando la potencialidad de esta citoquina en la combinación con células CAR-T para el tratamiento de tumores líquidos y sólidos complejos.

El acoplamiento de citoquinas a células T modificadas genéticamente ha sido revisado ampliamente en (Bell & Gottschalk, 2021). Además, la función de cada citoquina expresada por las células CAR-T modificadas se resume en la **Fig. 8**.



*La posible toxicidad asociada ha sido poco estudiada hasta el momento.

**Existe riesgo potencial de toxicidad (por la liberación de IFN γ), pero no se ha encontrado toxicidad grave asociada.

Figura 8. Principales citoquinas expresadas por las células CAR-T de 4^a generación y función que desempeñan.

La imagen resume las principales citoquinas expresadas por las células CAR-T modificadas. Además, se indica la necesidad de controlar su expresión debido a una toxicidad asociada a una expresión continua o administración sistémica, así como la función que desempeña sobre las células CAR-T o sobre el TME. En las funciones, el color verde indica una función beneficiosa, y el color rojo indica una función perjudicial. *Creada con BioRender.com.*

AICD: muerte celular inducida por activación (del inglés *activation-induced cell death*); TME: microambiente tumoral (del inglés *tumor microenvironment*).

8.3. Sistemas inducibles controlados exógenamente: Lent-On-Plus como alternativa para la generación de TRUCKs inducibles

Como hemos comentado, los sistemas inducibles basados en el uso del promotor NFAT han dado resultados notables cuando se han aplicado a la generación de TRUCKs inducibles, pues han conseguido reducir, al menos parcialmente, algunas toxicidades asociadas a la expresión continua de las citoquinas. Sin embargo, la incapacidad para regular de manera suficiente la expresión de IL-12 ha llevado a resultados clínicos no tan deseables, por lo que los sistemas de control exógeno de expresión surgen como una alternativa interesante para la regulación de la expresión de citoquinas. Entre ellos, el sistema ReoSwitch/Veledimex fue el primer sistema inducible exógeno evaluado en ensayo clínico, en el contexto de un vector adenoviral para su aplicación intratumoral liberando IL-12 en glioblastoma recurrente/progresivo, usando veledimex como inductor. Fuera de este sistema, los sistemas Tet-On son uno de los más estudiados, y los datos generados por algunos grupos trazan un camino optimista. Además, presentan una ventaja fundamental frente al control endógeno de la expresión: la regulación de la expresión génica es externa, por lo que, potencialmente, el clínico será capaz de inducir la liberación de la citoquina independientemente del estado de activación de la célula CAR-T (Tristan-Manzano et al., 2020). Sin embargo, los sistemas tradicionales Tet-On presentan ciertas limitaciones importantes a comentar: en primer lugar, los sistemas de inducción por doxiciclina más comúnmente usados (el sistema por excelencia Tet-On-3G, de Takara Bio, o el propio sistema propuesto por Alsaieedi y colaboradores (**Fig. 9, centro**), requieren concentraciones muy elevadas de doxiciclina (en este último caso 2 mg/ml) para la inducción *in vivo* (Alsaieedi et al.,

2019), lo que puede contribuir al establecimiento de resistencias bacterianas a largo plazo o mediante exposición intermitente (Tristán-Manzano et al., 2020). Además, la gran mayoría de sistemas contienen proteínas transactivadoras (el sistema ReoSwitch/Veledimex también depende de ellas), quimeras bacterianas/virales necesarias para detonar la transcripción del transgén bajo la acción de inductor. Este punto es fundamental, pues se deben de realizar consideraciones importantes de seguridad, ya que estos elementos parecen secuestrar factores de transcripción, que sumado a la capacidad de unirse a sitios *pseudo-tetO* a lo largo del genoma, pueden provocar la transactivación indeseada e inespecífica de genes (Whitsett & Perl, 2006) (Morimoto & Kopan, 2009) (Perl et al., 2009).

Una alternativa a considerar para la regulación de la expresión de moléculas bioactivas es el sistema Lent-On-Plus, un sistema de expresión génica condicionada publicado previamente por nuestro grupo (Benabdellah et al., 2016). El sistema Lent-On-Plus es un sistema Tet-On *all-in-one*, que permite la expresión del transgén en células T *in vitro* e *in vivo* bajo dosis mínimas de doxiciclina: 1-10 ng/ml *in vitro* y 10-100 ng/ml *in vivo* (Tristán-Manzano et al.), valores lejos del umbral de generación de resistencias bacterianas y de acción inmunosupresora. Es un sistema versátil, con una característica diferencial, carece de transactivadores: el sistema está formado por el represor de la tetraciclina original bacteriano (TetR) que, en ausencia de inductor, permanecerá unido a la región operadora de la tetraciclina (*tetO*) adyacente al promotor mínimo CMV, lo que bloqueará la expresión aguas abajo; en presencia del inductor, TetR se unirá a la doxiciclina, desbloqueando la región *tetO* y permitiendo la expresión génica (**Fig. 9, derecha**). El hecho de carecer de proteínas transactivadoras lo hace único en su clase y facilita su aplicación clínica, evitando los problemas

de seguridad derivados del uso de transactivadores. Por último, el sistema incorpora un aislador genético (Benabdellah et al., 2014) en la región 3'LTR, lo que, tras la retrotranscripción e integración, generará dos elementos aisladores físicos que provocarán un efecto barrera en las regiones LTRs, lo que permite minimizar el silenciamiento génico y favorece la ausencia de *leaking* (expresión en ausencia de inductor), algo fundamental cuando se controlan moléculas bioactivas.

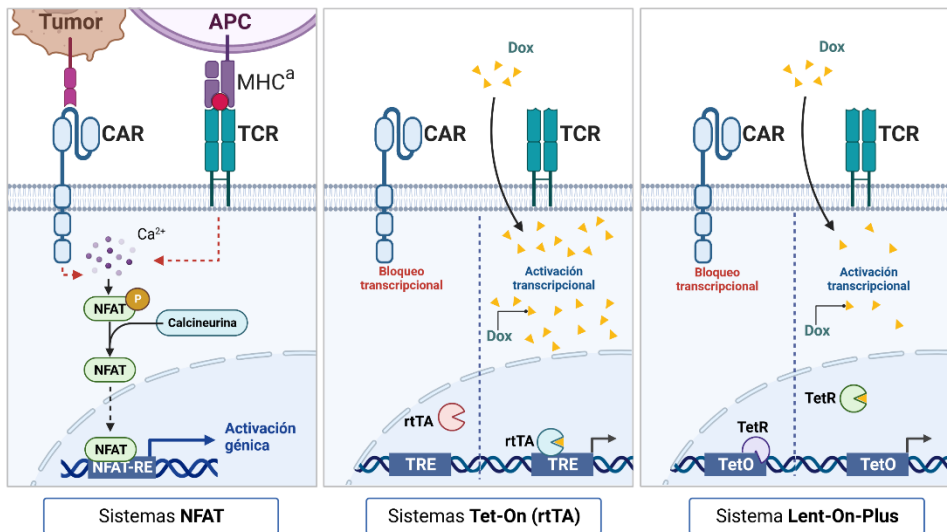


Figura 9. Sistemas de expresión inducible endógenos y exógenos.

A la **izquierda** se muestra el sistema de expresión inducible endógeno basado en el promotor NFAT: cuando la célula T se activa, se detona una cascada de señalización que finaliza con la activación de la expresión génica; en el **centro**, se muestra un sistema de expresión exógena Tet-On con transactivadores: cuando se añade tetraciclina o derivados, la proteína transactivadora rTA se une al inductor, que hace que el complejo se una al elemento de respuesta a Tet en el promotor, y detona la expresión génica; a la **derecha**, se muestra el sistema de expresión inducible exógena Lent-On-Plus: cuando se añade doxiciclina, el represor TetR se une al inductor, desbloqueando la región TetO aguas abajo del promotor, lo que permite la expresión génica de manera libre de transactivadores. Creada con BioRender.com.

CAR: receptor de antígeno quimérico (del inglés *chimeric antigen receptor*); TCR: receptor de la célula T (del inglés *T cell receptor*); MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*); Dox: doxiciclina; TRE: elemento de respuesta a Tet (del inglés *Tet-responsive element*).

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

La terapia CAR-T ha supuesto un éxito sin precedentes en el tratamiento de neoplasias hematológicas del linaje B, aportando una alternativa terapéutica a pacientes en situaciones de recaída o refractariedad a los tratamientos convencionales. Esto ha llevado a la aprobación de seis productos CAR-T por la FDA/EMA para el tratamiento de leucemias, linfomas y mieloma múltiple. Pese a los resultados obtenidos, la terapia se enfrenta a una serie de limitaciones en el tratamiento de tumores líquidos: 1) una alta tasa de recaída; 2) la existencia de efectos secundarios severos y potencialmente mortales; 3) el elevado coste y tiempo de manufactura del producto de infusión.

Por otra parte, las tasas de respuesta obtenida en el tratamiento de tumores sólidos se alejan considerablemente de las obtenidas tratando neoplasias hematológicas. Los tumores sólidos presentan barreras a la terapia CAR-T mucho más limitantes: 1) una elevada heterogeneidad intratumoral, lo que dificulta la elección de una diana para la redirección del CAR; 2) dificultad en el tráfico e infiltración tumoral por parte de las células CAR-T; 3) la presencia de un microambiente tumoral altamente inmunosupresor, que dificulta la actividad antitumoral de las células CAR-T.

Los nuevos desarrollos en el campo de las células CAR-T deben mejorar la eficacia antitumoral a la vez que reducen los efectos secundarios adversos. Nuestra **hipótesis** es que es posible incrementar la eficacia y seguridad de la terapia CAR-T regulando de forma fisiológica la expresión del CAR y de forma inducible la expresión de citoquinas u otras proteínas altamente bioactivas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo global de la presente tesis doctoral es generar **células CAR-T más potentes y seguras** para aplicación en linfomas agresivos y tumores sólidos. Para ello, se evaluará el uso de promotores fisiológicos, el uso de sistema Lent-On-Plus para controlar la expresión de IL-18, y se generarán células empaquetadoras que permitan incrementar la producción de vectores lentivirales. Los objetivos específicos son:

1. Desarrollo de nuevos promotores para una expresión fisiológica

- 1.1. Diseño y caracterización de los promotores
- 1.2. Cinética de expresión de GFP bajo los promotores fisiológicos
- 1.3. Expresión tejido – específica de GFP bajo los promotores quiméricos

2. Mejora de la actividad antitumoral de las células CAR-T19 controlando la expresión de IL-18: células iTRUCK19.18

- 2.1. Generación de células CAR-T secretoras de IL-18 (iTRUCK19.18)
- 2.2. Caracterización de las células iTRUCK19.18
- 2.3. Efecto de la inducción de IL-18 en la polarización de macrófagos
- 2.4. Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en un modelo de linfoma de Burkitt en presencia de Dox
- 2.5. Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en tumores B primarios en presencia de Dox
- 2.6. Generación de un modelo de adenocarcinoma pancreático metastásico CD19+

2.7. Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en un modelo de adenocarcinoma pancreático metastásico

3. Generación de células empaquetadoras más eficientes para la producción de VLs

3.1. Generación de células HEK-293T BAX-KO

3.2. Generación y de células HEK-293T BAX/BAK-KO (DKO)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

1.1. Líneas celulares humanas

Cultivos en suspensión

Las células Jurkat (ATCC TIB-152, células inmortalizadas de leucemia T), y las células Namalwa (ATCC CRL-1432, células B inmortalizadas de linfoma de Burkitt), se cultivaron con medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowest) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Biowest), en un incubador con atmósfera de 5% de CO₂, 37°C y humedad relativa (HR) entre 80-95%.

Cultivos adherentes

Las células BxPC-3 (ATCC CRL-1687, células inmortalizadas de adenocarcinoma pancreático), se cultivaron con medio RPMI-1640 (Biowest), suplementado con 10% de FBS (Biowest) y 1% de P/S (Biowest), en un incubador con atmósfera de 5% de CO₂, 37°C y HR entre 80-95%. Las células MIA PaCa2 (ATCC CRL-1420, células inmortalizadas de adenocarcinoma pancreático), y las células HEK-293T (ATCC CRL-1126, células embrionarias de riñón humano), se cultivaron con medio DMEM (Biowest) suplementado con 10% de FBS y 1% de P/S, en una atmósfera de 5% de CO₂ para las MIA PaCa-2 y 10% para las HEK-293T, 37°C y HR entre 80-95%. En este caso, la expansión celular se produjo con un lavado de tampón fosfato salino (PBS, Biowest), despegado celular con TRYPLE (Gibco), seguido de adición de medio DMEM (Biowest) completo.

Todas las células se mantuvieron a la densidad indicada por la ATCC para cada tipo celular, y fueron testadas rutinariamente para *Mycoplasma*.

1.2. Células T primarias

Las muestras de sangre periférica de donantes sanos y pacientes fueron cedidas por el servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada) bajo consentimiento informado, de acuerdo con las directrices del comité de ética y bajo la normativa española (RD-L 9/2014).

Las células T de donantes sanos fueron obtenidas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*). La sangre fue diluida 1/2-1/4 en PBS, y las PBMCs se aislaron mediante centrifugación con gradiente de Ficoll (Cytiva), sin freno ni aceleración durante 15' a 400g. Se recogió el anillo monolinfocitario y se lavaron con PBS (Biowest). Las células se cultivaron a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio TexMACS (Miltenyi Biotec) suplementado con 10 ng/ml de IL-7 e IL-15 (Miltenyi Biotec) y 1% de P/S (Biowest) en una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂.

Los PBMCs de paciente se obtuvieron a partir de 5-8ml de sangre de pacientes diagnosticados con linfoma de zona marginal (LZM) y leucemia linfocítica crónica (LLC) previos al tratamiento. Se aislaron los PBMCs con gradiente de Ficoll (Cytiva) como se ha descrito anteriormente, y se cultivaron a una densidad de 2×10^6 células/ml en una placa de 6 pocillos con medio TexMACS (Miltenyi Biotec) suplementado con 1% P/S (Biowest) y 5% de suero humano AB (Biowest). Además, para enriquecer el cultivo en células T, se suplementó con 40 UI/ml de IL-2 (Miltenyi Biotec) y 24 horas más tarde, se añadió TransAct (1:100, Miltenyi Biotec) durante 6 días previos a la transducción.

2. Vectores lentivirales

2.1. Vectores GFP constitutivos

- **CEWP:** el VL CEWP (2ª generación, autoinactivado) permite la expresión de eGFP (proteína verde fluorescente mejorada, del inglés *enhanced green fluorescent protein*) bajo el promotor del citomegalovirus (CMV). El VL fue generado en nuestro grupo (Benabdellah et al., 2011).
- **AWE:** el VL AWE (2ª generación, autoinactivado) permite la expresión de eGFP bajo el promotor AW. Este VL fue generado por nuestro grupo (Frecha et al., 2008).

2.2. Vector Lent-On-Plus (GFP, LOPeGFP)

El VL **Lent-On-Plus (LOPeGFP)** (2ª generación, autoinactivado) permite la expresión inducible de eGFP mediante doxiciclina. El VL expresa eGFP bajo el promotor CMVTetO, así como TetR mediante el promotor EF1α. El VL contiene el aislador IS2 en la región 3' LTR. Este VL ha sido generado por nuestro grupo (Benabdellah et al., 2016), patentado (WO2014140218A1, WO2012156535, WO2018083274A1) y licenciado en exclusiva por LentiStem Biotech.

2.3. Vectores IL-18

- **EIL18WP:** este VL (2ª generación, autoinactivado) permite la expresión de IL-18 humana bajo el promotor EF1α. Se sintetizó la región EF1α-IL18 flanqueada por los sitios de corte únicos EcoRI y SbfI (New England Biolabs) dentro de pUC19 sin ningún otro sitio de restricción, por la empresa ATG:biosynthetics (www.atg-biosynthetics.com) (EF1α descrito aquí: (Mizushima & Nagata, 1990) e IL-18 humana: NM_001386420.1). La región

se introdujo en el VL SEWP sustituyendo la región SFFV-eGFP mediante el siguiente proceso: el plásmido SEWP se cortó con las enzimas de restricción EcoRI y SbfI (New England Biolabs) durante 1h a 37°C, y el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa ultrapura (1% p/v). Se aisló la banda correspondiente por tamaño al vector sin la región SFFV-eGFP, y se realizó lo mismo con el pUC19 que contenía EF1 α -IL18, pero en este caso aislando la banda EF1 α -IL18, usando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Se realizó la ligación del inserto y el vector usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs) en una proporción inserto:vector 7:1 a 16°C durante toda la noche. El producto de ligación se utilizó como material para la transformación de bacterias competentes *E. coli* One Shot Stbl3 (ThermoFisher), añadiendo todo el producto de ligación a 200 μ l de bacterias: 20' en hielo, 45" a 42°C y 3' en hielo, 1h de recuperación con medio SOC (Invitrogen), para la siembra posterior en placa de LB-agar con ampicilina durante toda la noche. La determinación de las colonias positivas se realizó mediante PCR de colonias usando el siguiente programa: 1x (95°C, 10'); 35x (95°C, 30" / 62°C, 30" / 72°C, 30"); 1x (72°C, 10'), mediante el kit KAPA Taq PCR (Kapa Biosystems) y los siguientes oligonucleótidos (Sigma): Fw-cPPT y Rv-IL18 (**Tabla 4**). Se realizaron minipreps de las colonias positivas usando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), se corroboraron por su patrón de restricción usando HindIII (New England Biolabs) y por secuenciación. Se realizó una maxiprep a partir de una miniprep positiva secuenciada con el kit NucleoBond Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel), que se

comprobó por patrón de restricción y secuenciación nuevamente.

- **LOP18:** este VL (2ª generación, autoinactivado) permite la expresión de IL-18 humana en el entorno inducible del sistema Lent-On-Plus. IL-18 se digirió con *Ascl* y *Sbfl*, al igual que el vector LOPeGFP, para eliminar eGFP. El proceso fue igual al descrito anteriormente, pero utilizando los siguientes oligonucleótidos para la PCR de colonias: Fw-CMV y Rv-IL18 (**Tabla 4**).

2.4. Vector EhCD19

Este VL permite la expresión de CD19 humana (NCBI Gene ID: 930) bajo el promotor EF1 α . El VL ha sido diseñado por nuestro grupo (Tristán-Manzano et al., 2022).

2.5. Vectores CAR

- **ARI-0001:** este VL (3ª generación, autoinactivado) permite la expresión de un CAR α CD19 (A3B1/4-1BB/CD3 ζ) bajo el promotor EF1 α . El vector ha sido cedido amablemente por el Dr. Manel Juan y la Dra. María Castella, del Hospital Clínic (Barcelona). Este VL se describe aquí (Castella et al., 2019).
- **AWARI:** este vector se basa en una modificación del VL ARI-0001, con la diferencia de la expresión del CAR mediante el promotor AW en lugar de EF1 α . La modificación ha sido realizada por nuestro grupo (Tristán-Manzano et al., 2022).

3. Producción de vectores lentivirales

3.1. Producción

Para el proceso de producción de VLs, se utilizaron las células empaquetadoras HEK-293T (o las células modificadas a partir de éstas). Brevemente, se plaquearon células empaquetadoras para obtener una densidad del 90%. Las células se co-transfectaron con el plásmido de transferencia, el plásmido de empaquetamiento de VIH-1 (pCMVΔR8.9) (https://www.addgene.org/Didier_Trono/) y el plásmido de la envuelta VSV-G (pMD2.G) (https://www.addgene.org/Didier_Trono/), en una proporción 10:7:3 utilizando PEI (polietilenimina) (Alfa Aesar) como agente transfectante, usando medio DMEM (Biowest) sin FBS, mediante una incubación durante 20', para posteriormente añadir la mezcla gota a gota sobre las células. Pasadas 5 horas, se cambió el medio de las células, añadiendo DMEM (Biowest) suplementado con 10% de FBS (Biowest). El sobrenadante viral se recogió 48 y 72 horas después y se congeló a -80°C.

En los casos necesarios, los VLs se concentraron mediante ultracentrifugación, usando el rotor SW32 Ti (Beckman) a 23.000 rpm durante 2 horas a 4°C.

3.2. Titulación

El cálculo del título viral funcional se realizó mediante la transducción de células Jurkat (debido a que es un modelo inmortalizado de células T que permite una mayor modificación genética) con 3 diluciones seriadas de sobrenadante lentiviral, para asegurar que se mantiene la linealidad. 5 días después de la transducción, se determinó la expresión de la proteína de interés por 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%, porcentaje por debajo del cual se considera que se ha integrado una sola copia de ADN, mientras que por encima se pierde el rango lineal debido a la inserción de varias copias de ADN viral. El título viral se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título } \left(\frac{\text{UT}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células} \times (\% \text{células positivas} - \% \text{NTD})}{\text{volumen de VLs (ml)}}$$

A raíz del título viral, se puede calcular la multiplicidad de infección (MOI, del inglés *multiplicity of infection*):

$$\text{MOI} = \frac{\text{título (UT/ml)}}{\text{n}^\circ \text{ de células}} \times \text{volumen VLs (ml)}$$

4. Modificación genética

4.1. Transducción celular

En general, para la transducción celular, 100.000 células Jurkat en una placa de 48 pocillos fueron incubadas con los sobrenadantes virales en el menor volumen posible (150-200µl), siendo favorecida la transducción mediante la espinulación (centrifugación a 800g, 32°C, 30'). 5 horas post-transducción, se lavaron con PBS (Biowest) y se plaquearon según la densidad indicada por la ATCC con medio RPMI (Biowest) completo.

En el caso de las células T primarias, se incluyeron ciertas modificaciones al protocolo. Las células T primarias se activaron con una nanomatriz αCD3/CD28 (TransAct, 1:100, Miltenyi Biotec). 48 horas después, se incubaron con los VLs (en el caso de la co-transducción, las células T se incubaron con una mezcla de VLs ARI/AWARI y VLs IL-18) y se espinularon (centrifugación a 800g, 32°C durante 1h). 5 horas

después, las células T se lavaron y se añadió medio TexMACS (Miltenyi Biotec) suplementado con 10 ng/ml de IL-7 e IL-15 (Miltenyi Biotec).

En todos los casos, 3 días tras la transducción se determinó el porcentaje de expresión por citometría de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences).

4.2. Edición genómica

Para la generación de las células HEK-293T BAX-KO, se utilizó el sistema CRISPR-Cas9, así como las células HEK-293T como material de partida. En primer lugar, se formaron los complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) incubando la proteína recombinante Cas9 (IDT) con los diferentes ARNs guía (de manera individual) dirigidos frente al exón 3 (sgRNA 1_{BAX} : ggacgaactggacagtaaca) y al exón 4 (sgRNA 2_{BAX} : cgagaggtcttttccgagt) del locus BAX (chr19:48,954,875-48,961,798), en una proporción 1:3 durante 15' a temperatura ambiente. La mezcla fue introducida en aproximadamente 1×10^6 células diana (previamente despegadas) por electroporación usando el Nucleofector-4D y el kit SF Cell Line 4D X (Lonza), usando el programa predefinido para células HEK-293 (CM-130). Tras la electroporación, las células fueron cultivadas como se ha descrito previamente.

Las células HEK-293T BAX/BAK-KO fueron obtenidas siguiendo el mismo protocolo, pero utilizando como material de partida las células HEK-293T BAX-KO (editadas con sgRNA 2_{BAX}), y usando el sgRNA 1_{BAK} : cgatgatggcgagctgccgt, dirigido al exón 4 del locus BAK (chr6:33,572,552-33,580,276).

Diez días después de la electroporación, la edición fue confirmada por secuenciación. Para ello, se extrajo ADN genómico de las células editadas y de las células sin editar usando el kit QIAamp Genomic DNA

(Quiagen), se amplificó el sitio de corte por PCR usando el kit KAPA Taq PCR (Kapa Biosystems) en el termociclador Veriti (ThermoFisher), usando los primers (sgRNA 1 FW: ttttgcttcaggggtgagtt; sgRNA 1 RV: ccactttacttcaccccctgc; sgRNA 2 FW: gttggcctgttgcttttcat; sgRNA 2 RV: tcacctgctctttgatgtca; fw guide E4: cgagaccacatgtgagttca; rv guide E3: gcacctggttgggatatttc) y el siguiente programa: 1x (95°C, 5'); 40x (94°C, 45" / 62°C, 15" / 72°C, 30"); 1x (72°C, 10'), por duplicado. Se confirmó por electroforesis en gel de agarosa que el producto de PCR contenía el tamaño del amplicón indicado, y se purificó el producto de PCR con el kit QIAquick PCR Purification (Quiagen). Los productos de PCR purificados fueron enviados para su secuenciación Sanger (STAB VIDA, <https://www.stabvida.com>). El porcentaje de inserciones y deleciones (INDELS), así como el *KO score*, fueron obtenidos con la plataforma ICE (Synthego, <https://ice.synthego.com>).

5. Estudios funcionales

5.1. Cinéticas de expresión

En primer lugar, se partió de células T primarias de donantes sanos. Las células T se activaron con TransAct (Miltenyi Biotec), y 48h después, se transdujeron con los VLs codificantes para eGFP bajo los diferentes promotores. Las células T se mantuvieron sin estímulo durante 10 días tras la activación inicial, para que alcanzaran de nuevo un estado basal (a los 5 días se confirmó por citometría de flujo que expresaban eGFP en niveles similares entre todas las condiciones). Tras esto, se reactivaron con TransAct (1:100, Miltenyi Biotec) y se realizaron mediciones para determinar la expresión por citometría de flujo de eGFP y CD3 en cada punto temporal indicado.

5.2. Estudio de proliferación

Para el estudio de proliferación, partimos de 6×10^5 células T WT o previamente transducidas por condición, que se encuentran en estado basal. Teñimos con *Cell Trace Violet* (CTV) (ThermoFisher) 6×10^5 células por condición a $5 \mu\text{M}$ durante 10-12' a 37°C . Realizamos 2 lavados con 5 ml de PBS (Biowest) con 5% de suero humano AB (Biowest) a 450g 5'. Realizamos un lavado final con 10 ml de PBS (Biowest) y cultivamos a una densidad 1×10^6 células/ml. Activamos las células con TransAct (1:100, Miltenyi Biotec), y medimos la intensidad de expresión de CTV por citometría de flujo a los tiempos indicados.

5.3. Estudio de secreción de IL-18

Para el estudio de detección de IL-18 humana secretada, utilizamos las células HEK-Blue IL-18 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se plaquearon 3×10^5 células T por condición en 150 μl de medio TexMACS (Miltenyi Biotec) sin citoquinas. Las células se activaron con TransAct (1:150, Miltenyi Biotec), PMA (50 ng/ml) o PBS (control negativo de activación), y se recogieron y congelaron los sobrenadantes a las 24 horas. Por otra parte, se plaquearon 5×10^4 células HEK-Blue IL-18 por condición, y 24 horas después, se retiró el medio, se añadieron 20 μl de sobrenadante de las células T sobre las células HEK-Blue IL-18 junto a 180 μl de reactivo QUANTI-Blue. Tras una hora de incubación, se realizó la lectura con un espectrofotómetro a 620-655 nm. Cada muestra y cada lectura se realizó por duplicado, la cuantificación se realizó por interpolación con una curva estándar con concentraciones crecientes de IL-18 humana recombinante. Se utilizó IL-18 humana (1 ng/ml) (Invitrogen) como control positivo, así como otra citoquina como control negativo (IL-15, 1 ng/ml) (Miltenyi Biotec).

Las células HEK-Blue IL-18 permiten la detección exclusiva de IL-18 humana bioactiva, en un rango entre 10 pg – 1 ng/ml.

5.4. Estudio de activación celular

Se plaquearon 50.000 células T por condición y se activaron con TransAct (1:100, Miltenyi Biotec) o con PBS (Biowest, como células no estimuladas). Tras 30 minutos, se añadió Brefeldin A (1:1000, eBiosciences) y, tras 4 horas, las células T se tiñeron intracelularmente con anti-Hu IFN γ -FITC (4S.B3), anti-Hu Granzyme B-eFluor 450 (N4TL33) y anti-Hu IL-2-PE-Cyanine7 (MQ1-17H12), todos de eBiosciences (ThermoFisher), y se realizó la lectura por citometría de flujo con FACS Canto II (BD Biosciences).

5.5. Estudio de la polarización de macrófagos

Se descongelaron PBMCs de donantes sanos en una placa de 96 pocillos. Después de 24 horas, se separaron las células en suspensión (principalmente células T) y se sembraron en una nueva placa con medio TexMACS (Miltenyi Biotec) suplementado con IL-7 e IL-15 (Miltenyi Biotec) a las concentraciones descritas anteriormente, mientras que las células adherentes (monocitos/macrófagos) se cultivaron con medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 10% de FBS (Biowest). El cultivo de células T y macrófagos se llevó a cabo en paralelo. Los macrófagos primarios se suplementaron con 1) 50 ng/ml GM-CSF (PeproTech) (para la prepolarización a un fenotipo M1) o 2) 50 ng/ml M-CSF (PeproTech) (para la prepolarización a un fenotipo M2). 48 horas más tarde se refrescó el medio con citoquinas. 96 horas después se suplementaron con 1) 10 ng/ml de lipopolisacárido de *E. coli* (LPS, Sigma Aldrich) para la polarización final hacia M1 o con 2) 20 ng/ml de IL-4 (PeproTech) para la polarización final hacia M2. 18-20

horas más tarde se realizó una lectura confirmatoria por citometría de flujo.

En paralelo, las células T se activaron con TransAct (Miltenyi Biotec). 48 horas después fueron transducidas con los VLs ARI-0001 y LOP18, como se describió previamente. 72 horas después, se confirmó el % de células CAR+ e IL-18+ mediante citometría de flujo.

Las células iTRUCK19.18 se co-cultivaron con macrófagos polarizados del mismo donante para evitar el rechazo, y se añadieron 50 ng/ml de dox (Sigma Aldrich) en las condiciones requeridas, manteniendo la concentración cada 48 horas. La lectura por citometría de flujo se realizó al cabo de 6 días para confirmar 1) la polarización de los macrófagos, 2) el inmunofenotipo de las células T (fenotipo + agotamiento) y 3) la producción de citoquinas proinflamatorias.

5.6. Estudio de citotoxicidad

Células Namalwa

$7,5 \times 10^4$ células Namalwa que expresan GFP-Nluc se co-cultivaron con células T por duplicado en placas de 96 pocillos (ThermoFisher), manteniendo una proporción efectoras:diana (E:D) de 1:10 (calculado en función de las células CAR+), en medio TexMACS (Miltenyi Biotec) sin suplementar. Se realizaron re-estimulaciones tumorales añadiendo el mismo número de células tumorales que inicialmente. Se realizaron lecturas de la capacidad citotóxica medida por la pérdida de la población eGFP+ por citometría de flujo.

Tumores primarios

5×10^4 células tumorales primarias CD19+ aisladas a partir sangre periférica de pacientes con LZM y LLC no tratados se co-cultivaron con células T de donantes sanos o del mismo paciente transducidas con el

CAR y LOP18 con 3 proporciones E:D: 1:1; 1:2; 1:5 (calculado en base al porcentaje de células CAR+), en placas de 96 pocillos (ThermoFisher) por duplicado. La lectura de la citotoxicidad se realizó 13 horas tras el co-cultivo por citometría de flujo.

Células MIA PaCa2 CD19+

7,5x10³ células diana MIA PaCa2 que expresan 100% GFP-Nluc y 70% CD19 se cultivaron el día anterior a la adición de células T por duplicado en placas de 96 pocillos (ThermoFisher) con DMEM (Biowest) completo (+10%FBS, +1%P/S) (Biowest). Al día siguiente se incubaron con células T en una proporción E:D de 1:2 (calculando la proporción en función de las células CAR+) en TexMACS no suplementado durante 48 horas. Se realizaron re-estimulaciones tumorales añadiendo el mismo número de células tumorales que inicialmente.

Tanto en el caso de los tumores primarios, como en el caso de las células MIA PaCa2, el porcentaje de lisis específica se determinó mediante citometría de flujo en relación con la lisis basal producida por células T no transducidas. La lisis específica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Lisis específica} = 1 - \left(\frac{\%CD19+vivas \text{ (condición CAR)}}{\%CD19+vivas \text{ (condición NTD)}} \right) \times 100$$

(Fórmula adaptada de (Larson et al., 2022)).

6. Citometría de flujo

Detección del CAR

La determinación de la expresión del CAR se realizó mediante un anticuerpo primario IgG1 de cabra que se une al Fab murino conjugado con biotina (Jackson Immunoresearch), y Estreptavidina-APC

(ThermoFisher). Brevemente, las células se lavaron y se añadió el anticuerpo antiFab (1:100) durante 40'. Se lavaron las células y se añadió estreptavidina-APC (1:330) durante 30'. A los 15', se incorporaron los anticuerpos de superficie deseados. Las células se lavaron con 2 ml de PBS y se adquirieron para determinar el porcentaje de expresión del CAR y el resto de marcadores añadidos.

Detección de pro-IL-18 intracelular

Para todas las tinciones intracelulares, incluyendo ésta, se siguió el mismo protocolo: se lavaron las células y se tiñeron con CD3-PerCP-Cy5.5 (OKT3, 1:200, eBiosciences, ThermoFisher). Se lavaron las células, y se realizó la fijación y permeabilización con el kit Fix & Perm (Nordic MUBio). Brevemente, se añadieron 80 µl de reactivo de fijación A durante 20' a temperatura ambiente. Se lavaron las células y se añadieron 80 µl del reactivo de permeabilización B durante 10' a temperatura ambiente. Sin lavar, se añadió el anticuerpo anti-hIL-18 Propeptide-PE (74801, 1:20, R&D systems) durante 30' a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS y se realizó la adquisición.

Inmunofenotipo de las células T

Para el inmunofenotipado de las células T primarias, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45RA-FITC (HI-100, 1:200), CD62L-PE-Cy7 (DREG56, 1:200), CD3-PerCP-Cy5.5 (OKT3, 1:200), CD4-eFluor450 (RPA-T4, 1:100), PD1-APC (MIH4, 1:50), LAG-3-PE (3DS223H, 1:100), TIM-3-eFluor780 (F38-2E2, 1:50), todos de eBioscience (ThermoFisher).

Determinación de la señalización tónica

Para la determinación de la señalización tónica, se midió la fosforilación de CD3ζ por citometría de flujo usando el kit Fix & Perm (Nordic MUBio).

El anticuerpo usado fue pCD3 ζ -PE (Tyr142, 3ZBR4S, 1:100, ThermoFisher).

Determinación de citoquinas proinflamatorias

Mediante tinción intracelular, se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales: Hu-IFN-g-PE (45-15, Miltenyi) y Hu-TNFalpha-PE-Cyanine7 (Mab11, eBioscience).

Determinación de marcadores de AICD

Para la detección en membrana de los marcadores de AICD, se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-Human CD253 (TRAIL)-PE (RIK-2, BD Biosciences), anti-Hu CD95 (APO-1/Fas)-APC (DX2, eBiosciences) y Fas Ligand Ms Anti-Hu mAb-FITC (SB93a, Life Technologies).

Determinación de la apoptosis

Para la detección de la apoptosis, se utilizó el kit Violet Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen), según las instrucciones de fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en tampón de unión a anexina 1X, se tiñeron con AnnexinaV-Pacific Blue y SYTOX AADvanced, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendieron las muestras en tampón de unión a anexina y se procedió a la adquisición en el citómetro de flujo.

Caracterización de macrófagos

Para la caracterización de macrófagos primarios se utilizaron CD206-FITC (19.2, 1:100) y CD11c-PE (3.9, 1:50) de eBiosciences (ThermoFisher).

Caracterización de células tumorales

Para la caracterización de las células tumorales, se utilizaron CD19-APC (SJ25C1, 1:200, eBiosciences), CD44-FITC (DB105, Miltenyi), CD133-APC (13A4, eBiosciences), anti-Hu CD274 (PD-L1)-APC (MIH1, eBiosciences), anti-human CD119 (IFN γ R α chain) (GIR-208, Biolegend) y CD21-PE (HB5, 1:50, eBiosciences).

Las tinciones correspondientes a órganos de ratones se basaron en la disgregación mecánica y filtrado del homogeneizado, se bloquearon los receptores Fc γ usando α CD16/CD32 murino (ThermoFisher), FcR Blocking (Miltenyi Biotec) y 5% de suero de ratón (Sigma Aldrich).

Todas las tinciones se realizaron en oscuridad, en hielo, y los lavados se realizaron con *FACS buffer* (PBS + 3% BSA + 2 mM EDTA) a 400g 5', si no se indica lo contrario. Las tinciones de superficie se realizaron con aproximadamente 50.000 células, y las intracelulares con aproximadamente 100.000 células. Los citómetros usados para la adquisición fueron FACS Canto II y FACS Verse (BD Biosciences), realizando exclusión por singletes, así como por células vivas/muertas usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Fisher) en el momento de la adquisición, siempre que los canales correspondientes al láser violeta estuvieran libres y no hubiera permeabilización celular. En caso de las tinciones intracelulares, la viabilidad celular se determinó usando Ghost Dye Violet 510 (TONBO biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación celular absoluta se realizó usando CountBright Absolute Counting Beads (ThermoFisher), y la matriz de compensación se generó en base a controles simples o usando AbC Total Compensation capture beads + negative beads (ThermoFisher). El análisis de datos se realizó con el *software* FlowJo V10 (TreeStar).

7. Extracción de ARN y PCR cuantitativa

Se partió de aproximadamente 7×10^5 células T de las cual se extrajo ARN mensajero con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen). Una vez obtenido el ARN mensajero, se llevó a cabo la retrotranscripción del mismo, poniendo la misma cantidad de ARNm en todas las muestras, usando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher) y el siguiente programa: 1x (95°C, 15'); 40x (95°C, 15" / 60°C, 30" / 72°C, 30"); 1x (95°C, 1' / 55°C, 30" / 95°C, 30"), en un termociclador Veriti (ThermoFisher). Tras esto, se diluyó el ADN complementario (ADNc), y se llevó a cabo la PCR en tiempo real de todas las muestras por duplicado, utilizando los siguientes oligonucleótidos: Fw GFP, Rv GFP, Fw CD4, Rv CD4, Fw B2M y Rv B2M (**Tabla 4**). El programa utilizado fue el siguiente: 1x (95°C, 15'); 40x (95°C, 15" / 60°C, 30" / 72°C, 30"); 1x (95°C, 1' / 55°C, 30" / 95°C, 30"). El kit utilizado para la RT-PCR fue KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems), utilizando la misma cantidad de ADNc en todas las muestras y como control negativo de la PCR se usó agua ultrapura (Invitrogen). Los resultados se relativizaron frente al ADNc de GAPDH (Fw GAPDH: atggggaaggtgaaggtcg; Rv GAPDH: tattgtgcatcaatgacccc). Los datos fueron analizados con el programa MxPro (Agilent).

8. Preparación de doxiciclina

El hclato de doxiciclina (Sigma Aldrich) se disolvió en agua ultrapura (Invitrogen), se filtró por filtro de 45 μm y se alicuoteó para su almacenaje en oscuridad a -20°C, a una concentración de 10 mg/ml.

9. Modelos animales y análisis de bioluminiscencia

9.1. Modelos animales

Para la generación del modelo murino de linfoma de Burkitt, se inocularon 0.3×10^6 células Namalwa GFP-Nluc vía intravenosa en ratones NOD/scid-IL-2Rnull (NSG) de 10 a 12 semanas de edad. 3 o 6 días después, se inocularon las células CAR-T vía intravenosa. En los casos indicados, se realizaron re-inoculaciones tumorales. Todas las administraciones intravenosas se realizaron por la vena de la cola.

Para la generación del modelo de tumor pancreático ortotópico, ratones NSG de 8 a 10 semanas se anestesiaron con isofluorano gaseoso (Isoflurin, Fatro). Se realizó un proceso quirúrgico en el que se abrió la piel y la capa muscular, y se realizó la inyección de células MIA PaCa2 GFP-Nluc (70% CD19+ o CD19-) embebidas en matrigel (Corning) (en proporción 1:1) en la cola del páncreas. Se suturaron ambas capas epiteliales, se cerraron las heridas con grapas quirúrgicas, manteniéndose los ratones en mantas calefactadas para su recuperación. Las grapas se retiraron cuando la herida se encontraba cerrada (aproximadamente 4 días tras la cirugía).

9.2. Análisis de bioluminiscencia

Para el análisis de bioluminiscencia, se diluyó furimazina (NanoGlo, Promega) 60 veces en PBS (Biowest) en fresco, y se administraron 150 μ l a los ratones vía intraperitoneal en el momento previo a la adquisición de la imagen, usando el analizador IVIS Spectrum (Caliper, Perkin Elmer). Las imágenes se adquirieron durante 3 minutos, en campo abierto, y se analizaron usando Living Image 3.2 (Perkin Elmer) o AURA Imaging 4.0.7 (Spectral Instruments Imaging).

9.3. Sacrificio de los animales

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical cuando mostraron una elevada señal de bioluminiscencia, cuando experimentaron una pérdida de peso >20% del peso inicial o cuando mostraron signos evidentes de dolor o de EICH. Se preservó el bienestar de todos los animales de experimentación por encima de la obtención de resultados.

10. Diseño de promotores quiméricos

CD4: la estructura del promotor CD4 contiene una región *enhancer* descrita por Sawada y colaboradores (Sawada & Littman, 1991), así como un promotor mínimo definido por Marodon y colaboradores (Marodon et al., 2003). Aguas abajo se añadió un promotor definido en EPD (chr12:6789491-6789550), y en el extremo 3' se añadió una zona silenciadora/*enhancer* CD4 descrita por Donda y colaboradores (Donda et al., 1996).

B2M: la estructura del promotor B2M contiene un promotor definido por Genecopoeia (chr15:45002449-45003706). También se añadió un promotor definido por EPD (chr15:45003666-45003725) aguas abajo, y el promotor 3 definido por Switchgear. Estos dos últimos solapan parcialmente con el exón 1 de la B2M. En la región 5' se ha colocado una región definida por Ensembl como *enhancer* (chr15:45004699-45004998), y en la región 3', otro promotor definido por Switchgear que solapa con el exón 2.

Los promotores **CMV** (Boom et al., 1988) y **AW** (Frecha et al., 2008) han sido descritos previamente.

11. Análisis de sitios de unión de factores de transcripción

Para la predicción computacional de islas CpG en la secuencia de cada promotor se utilizó SoftberryCpGFinder (<https://www.softberry.com>), y se aplicaron los parámetros definidos por Gardiner-Garden & Frommer (*length* \geq 200 bp, *ObsCpG/ExpCpG* \geq 0.6, *and* %GC \geq 50%) (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Para el análisis predictivo de TFBS putativos en las secuencias promotoras se emplearon las herramientas PROMO y Alibaba2, las cuales usan la base de datos TRANSFAC. Los resultados de la búsqueda en PROMO fueron restringidos añadiendo los parámetros de filtro “únicamente factores humanos” y “únicamente sitios humanos”, se ajustó a 0% el umbral de disimilitud entre secuencia y matriz. De modo similar, en Alibaba2.1, se ajustó a 80% la “conservación mínima de la matriz” y a 100% la “similitud de la secuencia y con la matriz”. El conjunto de datos se representó en un diagrama de Venn, utilizando el programa InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/>).

12. Análisis de datos

El análisis de datos se realizó con GraphPad Prism 9 (Dotmatics). Los datos se muestran como media \pm SEM, y cada test estadístico utilizado se indica en el correspondiente pie de figura.

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos utilizados.

ID	Secuencia (5' a 3')
Fw-cPPT	ggtacagtgcaggggaaaga
Rv-IL18	tcagagaagtgtcccagga
Fw-CMV	cgggggaggtctatataagc
Fw GFP	aagctgaccctgaagttcat
Rv GFP	cgtcgtcctgaagaagat
Fw CD4	agaaagacgcaagcccag
Rv CD4	gcagcaccagaagcaagt
Fw B2M	tagctgtgctcgcgctac
Rv B2M	gatggatgaaaccagacac

RESULTADOS

1. Desarrollo de nuevos promotores para una expresión fisiológica

1.1. Diseño y caracterización de los promotores

A lo largo del manuscrito se ha destacado la importancia de controlar la actividad de las células CAR-T para reducir los efectos secundarios asociados con la sobreactivación celular. *A priori*, parece lógico pensar que una expresión elevada y sostenida del CAR produzca una terapia más eficaz. Sin embargo, el equipo del Dr. Sadelain abrió la puerta a un cambio de paradigma al demostrar que forzar al CAR a seguir la cinética de expresión del TCR tras el encuentro con el antígeno mejoraba la actividad antitumoral. Esto se debe al mantenimiento de un fenotipo menos diferenciado, una señalización tónica más baja y un menor agotamiento. En resumen, este y otros estudios posteriores sentaron las bases de que una expresión "fisiológica" puede favorecer una terapia más duradera y segura.

En este estudio, se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 en conjunto con AAVs para insertar el CAR en el locus TRAC. A pesar de la optimización y la rapidez del avance en cuanto a la seguridad del sistema CRISPR-Cas9, la traslación clínica sigue siendo problemática en la actualidad debido a ciertas limitaciones, como cortes fuera de diana, generación de grandes deleciones al editar el TCR o traslocaciones cromosómicas al realizar cortes múltiples. Como alternativa, proponemos el uso de "promotores fisiológicos" dentro de los VLs, que se encuentran ampliamente en la clínica y cuya seguridad está comprobada, en particular en células T.

En principio, una manera posible de lograr esto sería utilizar el promotor del locus del TCR. Sin embargo, el TCR (al igual que las

inmunoglobulinas) está codificado por segmentos de genes que se reorganizan para producir la unidad de transcripción de las cadenas polipeptídicas del receptor, lo que hace muy difícil definir un promotor mínimo para este receptor.

Previamente, nuestro grupo ha desarrollado un promotor basado en el locus de WAS (promotor AW), con el que se consigue que una CAR α CD19 mimetice de manera precisa el patrón de expresión del TCR tras exposición antigénica (Tristán-Manzano et al., 2022). Sin embargo, los niveles de expresión conseguidos son bajos, por lo que realizamos una búsqueda de promotores que permitan esta expresión TCR-like con una mayor intensidad de expresión. En base a esto, seleccionamos dos genes de interés: CD4 y B2M como potenciales candidatos a presentar un perfil de expresión similar al del TCR. CD4 está implicada en la ruta de señalización del TCR, mientras que algunos estudios sugieren que B2M presenta también un patrón de expresión similar al TCR.

Pese a que el diseño de los promotores se detalla en la sección M&M, de manera general, los promotores se diseñaron mediante combinación de regiones *enhancer*, regiones promotoras y regiones de elevada importancia descritas en trabajos previos (Fig. 10).

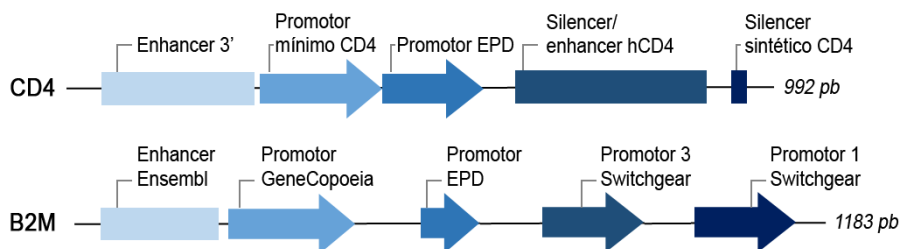


Figura 10. Estructura de los promotores quiméricos.

Arriba, promotor basado en CD4. Abajo, promotor basado en B2M. La generación de los promotores se detalla en la sección de materiales y métodos.

Una vez diseñados los promotores, se procedió a caracterizarlos *in silico*. En esta caracterización se incluyeron cuatro promotores: CD4 y B2M como nuestros promotores candidatos; EF1 α , que es un promotor clásico utilizado para expresar CARs; y AW como promotor control de expresión fisiológica. El análisis se llevó a cabo en la región comprendida entre las LTRs, y luego se restringió la búsqueda de elementos únicamente a la región promotora.

En primer lugar, se examinó la presencia de cajas TATA buscando secuencias consenso, que son elementos promotores centrales. La búsqueda reveló la presencia de dos cajas TATA en EF1 α , una en B2M y ninguna en CD4 ni AW, lo cual es común en varios genes de linaje hematopoyético (Petrella et al., 1998). A continuación, se consultó la presencia de islas CpG, que son características de los promotores eucariotas (Deaton & Bird, 2011), y se examinó si contenían sitios de unión al factor de transcripción constitutivo Sp-1. Los promotores eucariotas con sitios Sp-1 dentro de las islas CpG suelen tener un estado hipometilado, lo que se asocia generalmente a una acción promotora fuerte (Rad et al., 2020). Dentro de la región promotora, solo EF1 α y AW contienen una isla CpG completa, mientras que CD4 solo contiene 15 pb y en B2M no se predice ninguna. Es importante destacar que dentro de los promotores que contienen islas CpG completas, EF1 α contiene 12 sitios de unión a Sp-1 dentro de la isla CpG, mientras que AW contiene 5. Esto podría explicar la "fuerza" del promotor EF1 α .

En relación al análisis de sitios de unión de factores de transcripción, se observó que B2M presentó 23 sitios de unión, CD4 20, EF1 α 18 y AW 15 (**Fig. 11A**). Se encontraron cuatro sitios compartidos por todos los promotores, siendo Sp-1 el más destacado, mientras que todos los promotores excepto EF1 α presentaron sitio de unión a FOXP3 (**Fig. 11B**). Aunque FOXP3 es un regulador maestro de células Treg, se ha

descrito que puede actuar como un regulador negativo en la producción de citoquinas proinflamatorias tras la activación de la célula T convencional (Bettelli et al., 2005) (McMurphy et al., 2013).

Estos tres promotores comparten también el sitio de unión a STAT4, cuya ruta se activa por la presencia de IL-12 y que es clave para mediar la respuesta de IFN, así como en la regulación de la diferenciación de células T colaboradoras a Th1. Aunque los factores de la familia STAT se han asociado con la activación transcripcional, STAT4 también se ha asociado con represión transcripcional en células T (O'Shea et al., 2011).

Otro sitio interesante compartido por B2M y AW es XBP-1, un factor de transcripción implicado en la señalización por estrés del retículo endoplasmático e hipoxia, como puede ocurrir en el TME, que acelera la proliferación celular (Pramanik et al., 2018) e incrementa la secreción de citoquinas proinflamatorias, entre otras funciones. Este tipo de estrés y la regulación al alza de este factor XBP1 se ha descrito en linfocitos infiltrantes de tumor de ovario, privados de captación de glucosa (Li et al., 2019).

Por último, destacamos el sitio de unión a ISGF-3, presente exclusivamente en el promotor EF1 α , un factor que puede estar implicado en la transcripción de genes estimulados por interferón y que conduce a la célula a un estado antiviral (Schoggins et al., 2011).

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos a través de este análisis *in silico* son meramente predictivos y, por lo tanto, podrían no reflejar una función real en las células T. No obstante, se ha llevado a cabo como una herramienta para plantear una hipótesis inicial que permita explicar las diferencias en la expresión génica observadas posteriormente al expresar un transgén bajo el control de estos

promotores. En resumen, estos resultados sugieren que las variaciones en la expresión génica que se detallarán a continuación podrían estar influenciadas, en mayor o menor medida, por los diferentes sitios de unión a factores de transcripción presentes en los promotores, así como por las variaciones en los elementos promotores centrales.

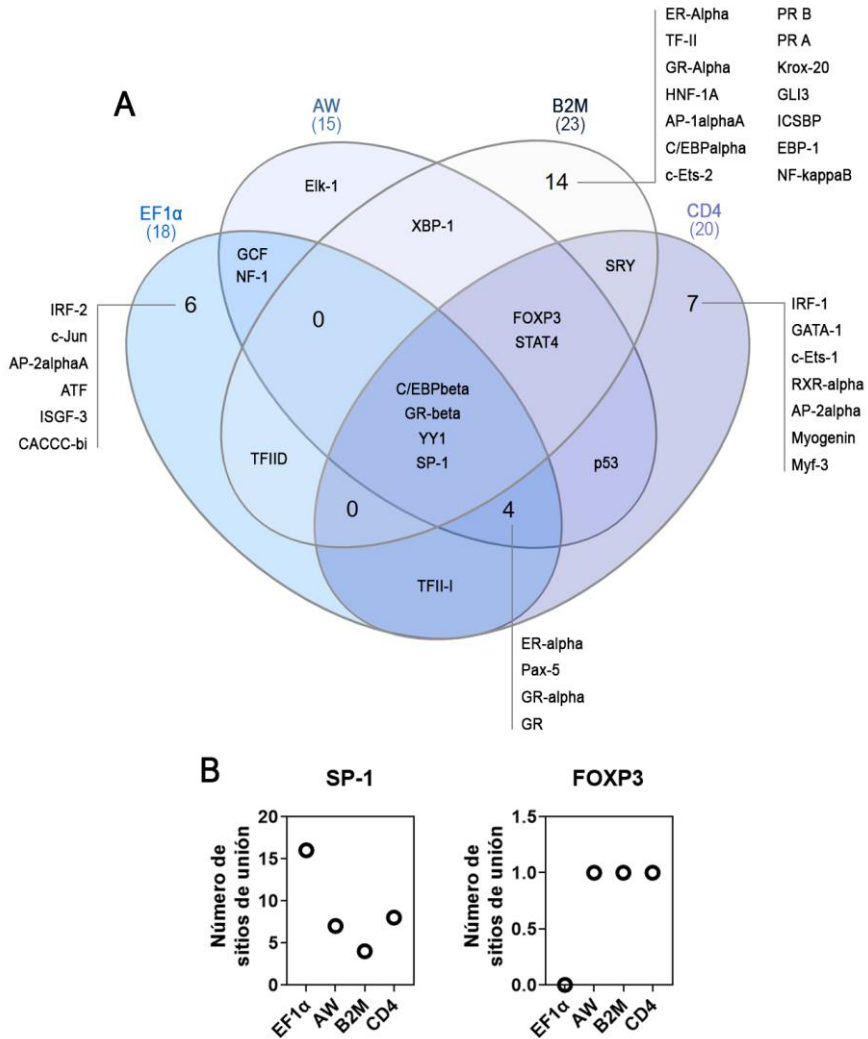


Figura 11. Análisis *in silico* de los promotores quiméricos.

A) Diagrama de Venn representando los sitios de unión de factores de transcripción presentes en los promotores B2M, CD4, AW y EF1α. **B)** Gráficas que indican el número total de sitios de unión a los factores Sp-1 (izquierda) y FOXP3 (derecha) en la región promotora.

1.2. Cinética de expresión de GFP bajo los promotores fisiológicos

Una vez diseñados y caracterizados los promotores, evaluamos la cinética de expresión de GFP bajo el control de los promotores CD4, B2M, AW y CMV como control de promotor fuerte. Para ello, activamos células T primarias con una nanomatriz de α CD3/CD28 (TransAct) y las transdujimos con VLs expresando GFP bajo los diferentes promotores, obteniendo porcentajes de expresión de GFP comparables. Luego de confirmar la expresión de GFP mediante citometría de flujo, las células se mantuvieron en condiciones de reposo (*resting*) para conseguir el nivel basal de la expresión transgén durante 10 días post-activación inicial. Posteriormente, las volvimos a activar vía TCR con TransAct para simular una estimulación antigénica, midiendo en distintos momentos la expresión de GFP y de CD3 como control de la cinética de expresión del TCR:CD3 (**Fig. 12A**).

Tras la estimulación, observamos una rápida internalización del complejo TCR:CD3 después del encuentro antigénico, lo que redujo casi diez veces la expresión 24 horas después, y se recuperó completamente a los 7 días (**Fig. 12B, izquierda, C y D, línea negra**). Esta cinética del TCR endógeno fue mimetizada por GFP bajo el promotor B2M (**Fig. 12B, derecha**), alcanzando niveles bajos a las 24 horas, que volvieron a subir a partir de las 72 horas, tanto a nivel de porcentaje (**Fig. 12C, promotor B2M**) como a nivel de intensidad de expresión (**Fig. 12D, promotor B2M**).

En el caso del promotor CD4, la expresión de GFP se mantuvo estable en el tiempo tras la exposición antigénica (**Fig. 12C, promotor CD4, D, promotor CD4**), a pesar de no internalizarse como el TCR. Además, se

incluyó el promotor AW como promotor control de expresión fisiológica (que, como pudimos observar, permite que GFP mimetice la internalización del TCR) (**Fig. 12D, promotor AW**) y el promotor CMV, un promotor viral de expresión muy elevada, como control de expresión anti-fisiológica. Con este último, pese a que el porcentaje de células GFP+ no se disparó en exceso (**Fig. 12C, promotor CMV**), observamos un aumento en la expresión de GFP a los 7 días de casi 10 veces en comparación con el punto inicial (**Fig. 12D, promotor CMV**).

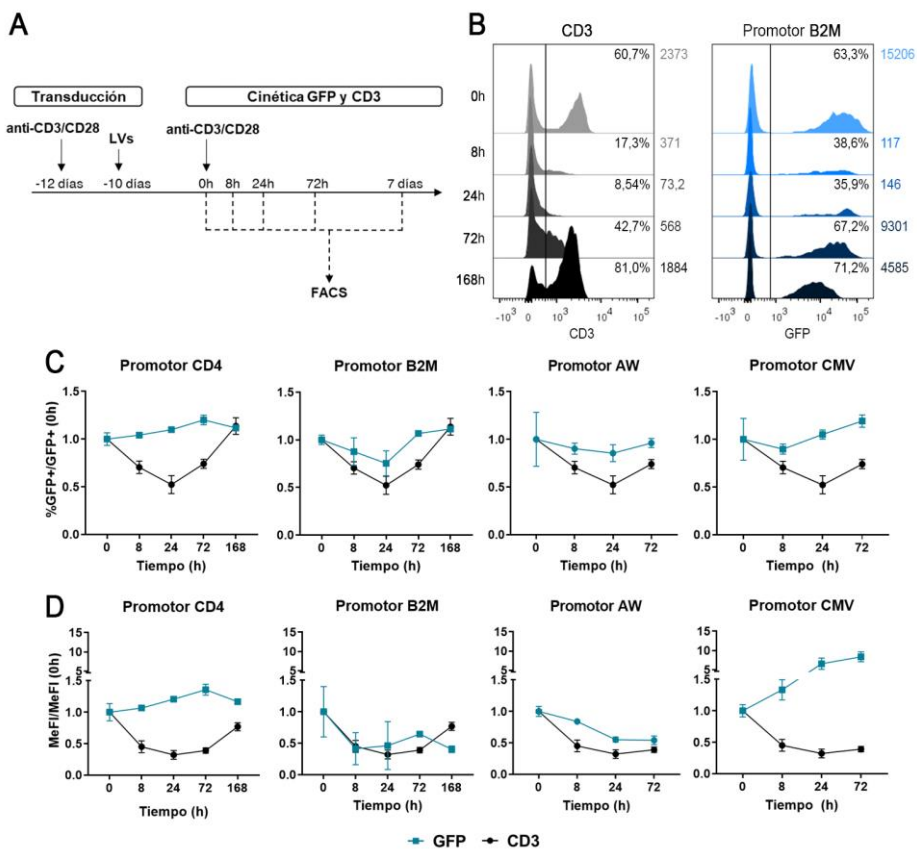


Figura 12. Cinética de expresión de GFP bajo los promotores CD4, B2M, AW y CMV en células T primarias.

A) Esquema del procedimiento experimental del estudio de la cinética de expresión. **B)** Histogramas representativos de la cinética de expresión de CD3 (izquierda) y de GFP bajo el promotor B2M (derecha) tras estimulación antigénica a diferentes tiempos. Se muestra el porcentaje de células positivas

para CD3 y GFP, así como el MeFI de CD3 y GFP de la población total. **C)** Gráficas correspondientes a la cinética de expresión de GFP a nivel de porcentaje bajo los distintos promotores quiméricos (línea azul) y de CD3 (línea negra) a diferentes tiempos (se representa %GFP o CD3+ entre %GFP o CD3+ a tiempo 0). **D)** Gráficas correspondientes a la cinética de expresión de GFP a nivel de intensidad de expresión bajo los distintos promotores quiméricos (línea azul) y de CD3 (línea negra) a diferentes tiempos (se representa MeFI de GFP o CD3 entre MeFI de GFP o CD3 a tiempo 0) (B2M: n=3; CD4: n=6; CMV: n=7; AW: n=6; CD3: n=11).

LVs: vectores lentivirales (del inglés *lentiviral vectors*); MeFI: mediana de intensidad de fluorescencia (del inglés *median of fluorescence intensity*).

Cinética en diferentes poblaciones. A continuación, decidimos investigar la estabilidad en el mantenimiento de la expresión fisiológica. Nos interesaba conocer si este perfil de expresión génica se presentaba preferencialmente en ciertas subpoblaciones de células T o no. Por lo tanto, en primer lugar, evaluamos el porcentaje de células GFP+ controlada por el promotor CD4 en células T CD4+ y CD8+. Observamos que la expresión era ligeramente más moderada en células T CD4+ mientras que en células T CD8+ se alejaba un poco más de la expresión endógena del TCR (**Fig. 13**).

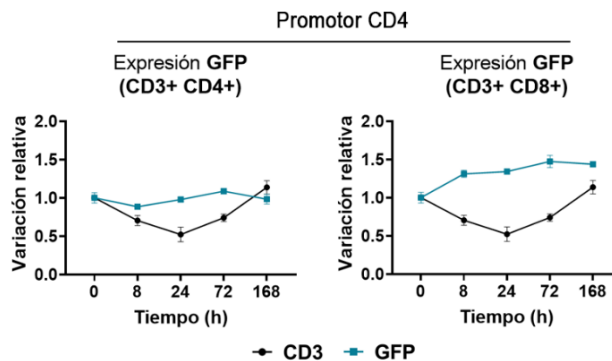


Figura 13. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 en células T primarias CD4+ y CD8+.

Gráficas que indican la cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 (línea azul) y de CD3 (línea negra) en células T CD4 (izquierda) y CD8 (derecha) (CD4: n=6; CD3: n=11). Variación relativa = (% células GFP+/% células GFP+ a tiempo 0).

Tras esto, estudiamos el patrón de expresión de GFP bajo CD4 en los diferentes estadios fenotípicos y, curiosamente, comprobamos que la expresión fisiológica del transgén se mantenía en mayor medida en estadios T memoria ($T_{naive/SCM}$, T_{CM} y T_{EM}), mientras que las células T_{EF} incrementaban la expresión de GFP durante las primeras 24 horas para restaurarse a los 7 días (Fig. 14).

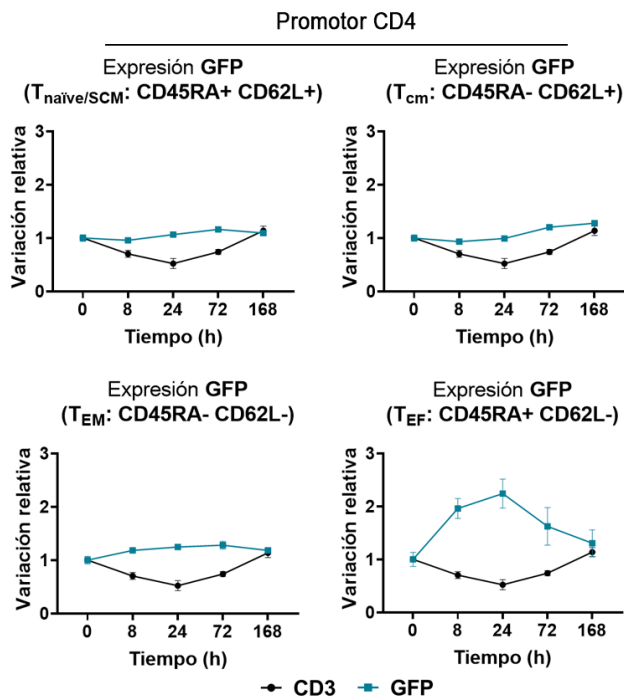


Figura 14. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 en células T primarias en diferentes subpoblaciones fenotípicas.

Gráficas que indican la cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 (línea azul) y de CD3 (línea negra) en células $T_{naive/SCM}$ (izquierda, arriba), células T_{CM} (derecha, arriba), células T_{EM} (izquierda, abajo) y células T_{EF} (derecha, abajo) (CD4: n=6; CD3: n=11). Variación relativa = (% células GFP+/% células GFP+ a tiempo 0).

También investigamos si el comportamiento de GFP bajo B2M variaba de manera similar a como lo hicimos con CD4. Sin embargo, en este caso no observamos diferencias en la cinética de expresión de GFP entre las células T CD4+ y CD8+. La expresión en ambos casos fue muy similar y reflejó el comportamiento del TCR endógeno (**Fig. 15**).

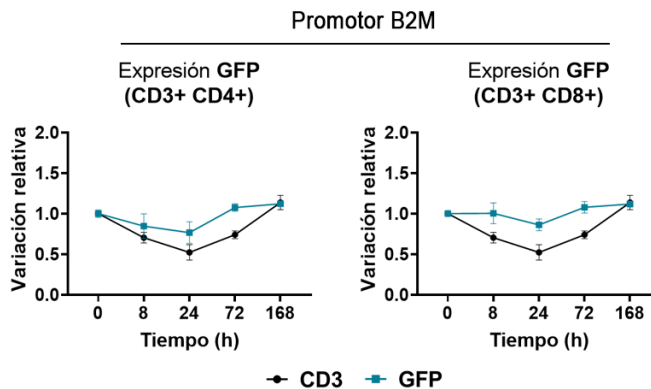


Figura 15. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M en células T primarias CD4+ y CD8+.

Gráficas que indican la cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M (línea azul) y de CD3 (línea negra) en células T CD4 (izquierda) y CD8 (derecha) (B2M: n=3; CD3: n=11). Variación relativa = (% células GFP+/% células GFP+ a tiempo 0).

Al analizar las poblaciones fenotípicas, encontramos fuertes similitudes tanto en la población T_{naïve/SCM} como en las células T_{EF} con respecto al TCR endógeno. En la población T_{CM}, observamos un aumento en la expresión de GFP a las 8 horas, seguido de una pérdida completa de expresión y una recuperación de los niveles originales a partir de las 72 horas. En cambio, la población T_{EM} presentó un patrón de expresión de GFP más discordante en comparación con el TCR endógeno (**Fig. 16**). Sin embargo, esta variación solo duplicó la expresión inicial de GFP.

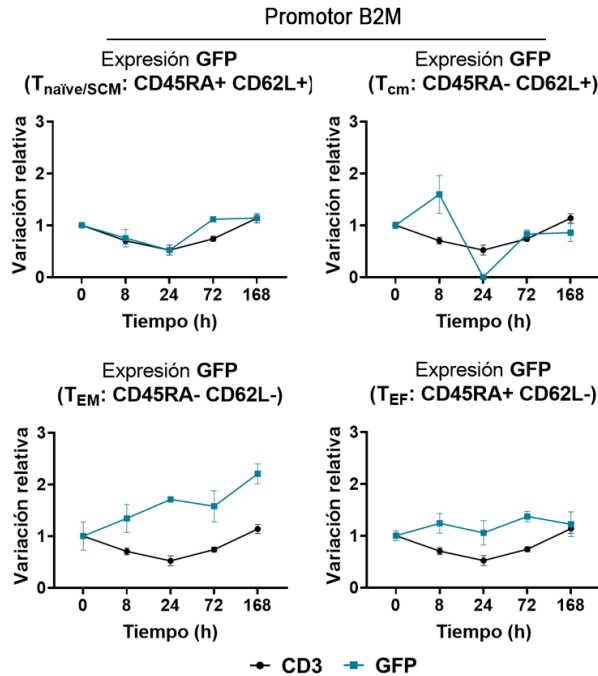


Figura 16. Cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M en células T primarias en diferentes subpoblaciones fenotípicas.

Gráficas que indican la cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M (línea azul) y de CD3 (línea negra) en células T_{naive/SCM} (izquierda, arriba), células T_{CM} (derecha, arriba), células T_{EM} (izquierda, abajo) y células T_{EF} (derecha, abajo) (B2M: n=3; CD3: n=11). Variación relativa = (% células GFP+/% células GFP+ a tiempo 0).

Comparativa con promotores endógenos. Finalmente, quisimos corroborar la similitud en la expresión de GFP bajo los dos promotores, no solo con el TCR, sino también con respecto a las moléculas a partir de las cuales derivan los promotores. Por lo tanto, verificamos a nivel de ARN que la expresión de GFP controlada por CD4 imita el patrón de expresión natural de CD4, mientras que la expresión de GFP controlada por el promotor B2M imita el patrón de expresión endógeno de B2M después de un encuentro antigénico (**Fig. 17**).

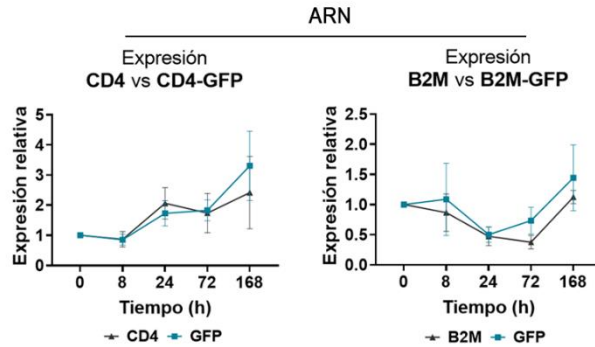


Figura 17. Cinética de expresión de GFP bajo los promotores CD4 y B2M en comparación con la expresión endógena de CD4 y B2M.

Gráficas que muestran la cinética de expresión de GFP bajo el promotor CD4 (línea azul) y de CD4 (línea negra) (izquierda), así como la cinética de expresión de GFP bajo el promotor B2M (línea azul) y de B2M (línea negra) (derecha), en todos los casos a nivel de ARN (GFP-CD4: n=6; CD4: n=6; GFP-B2M: n=3; B2M: n=3).

1.3. Expresión tejido – específica de GFP bajo los promotores quiméricos

Promotor CD4. Como se ha comprobado previamente, el promotor CD4 reduce considerablemente la sobreexpresión de GFP en comparación con el promotor CMV. Sin embargo, este promotor no imita completamente la expresión del TCR endógeno, ya que mantiene niveles estables de expresión con el tiempo. A pesar de esto, el promotor CD4 endógeno presenta una particularidad: su expresión génica restringida a células que naturalmente expresan CD4. Para comprobar si nuestro promotor sintético basado en el locus CD4 mantiene estas características, transdujimos células T primarias y células Jurkat (que expresan niveles elevados de CD4), células Namalwa (que expresan niveles menores de CD4) y células BxPC-3 y HEK-293T (que no expresan CD4).

Observamos unos mayores niveles de expresión de GFP en las células que expresan CD4: las células T primarias, las células Jurkat y las células Namalwa expresaron niveles medios-altos de GFP. Por otra parte, observamos menores niveles de expresión de GFP en células naturalmente CD4-, como las BxPC-3 y HEK-239T (**Fig. 18A, B**). En estos dos tipos celulares no solo se redujo considerablemente el porcentaje de células que expresaban GFP (**Fig. 18B, gráfica izquierda**), sino que entre las células GFP+, la intensidad de expresión también fue menor (**Fig. 18B, gráfica derecha**). Estos resultados muestran la especificidad del promotor CD4 para la expresión específica de transgenes en células que expresan naturalmente CD4.

Además, observamos que, dentro de las células T primarias, tanto la subpoblación CD4+ como la CD8+ expresaban GFP de manera similar a nivel porcentual (**Fig. 18C, gráfica izquierda**), aunque dentro de las células GFP+, las células T CD4+ expresaron niveles de GFP significativamente más elevados que las células T CD8+ (**Fig. 18C, gráfica derecha**).

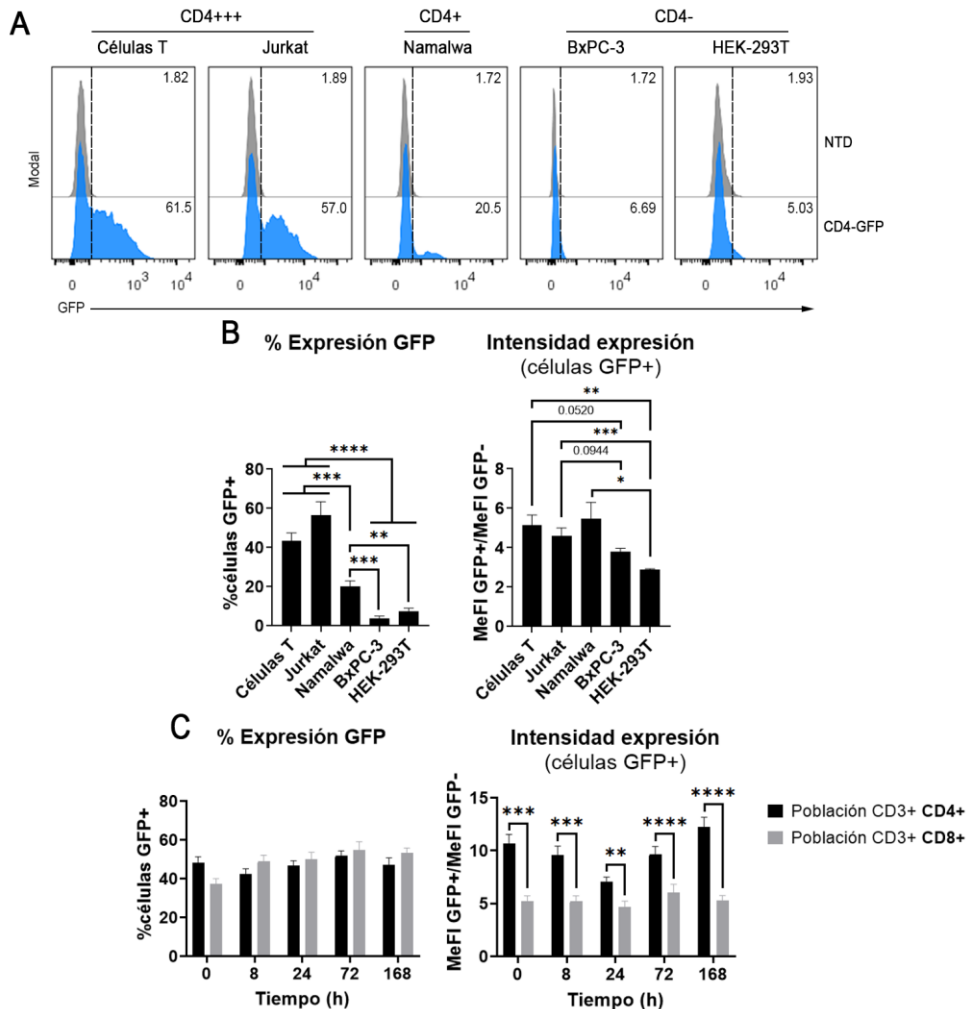


Figura 18. Expresión tejido-específica de GFP bajo el promotor CD4.

A) Histogramas representativos de la expresión de la expresión de GFP bajo el promotor CD4 en células T primarias y Jurkat (CD4+++), células Namalwa (CD4+), células BxPC-3 y HEK-293T (CD4-). **B)** Gráficas que muestran el porcentaje de células GFP+ (**izquierda**) y la intensidad de expresión relativa de las células GFP+ (**derecha**) bajo el promotor CD4 en los 5 tipos celulares descritos previamente (n=6). **C)** Variación temporal del porcentaje de células GFP+ bajo el promotor CD4 en células T CD4+ y CD8+ (**izquierda**), así como la intensidad de expresión relativa de las células GFP+ (**derecha**) en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ (n=6). El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Promotor B2M. A diferencia de CD4, que se expresa de forma selectiva en ciertos tipos celulares, B2M se expresa en todas las células nucleadas por lo que, teóricamente, la utilización de un promotor derivado de B2M para controlar la expresión de GFP debería resultar en una expresión génica no restringida a tejido.

Para verificar esta hipótesis, transdujimos células T primarias, células Jurkat, células Namalwa y células HEK-293T con VLs que codificaban GFP bajo el control del promotor B2M, y observamos >50% células GFP+ en todos los tipos celulares estudiados incluyendo las células HEK-293T (cosa que no ocurre con el promotor CD4), a excepción de las células Namalwa, que mostraron un menor porcentaje de células GFP+ (**Fig. 19A, B, gráfica izquierda**). Dentro de las células GFP+, observamos que las células T primarias presentaron una mayor intensidad de expresión de GFP (**Fig. 19B, gráfica derecha**) en comparación con el resto de tipos celulares. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que no existe una restricción en la expresión génica de GFP bajo el promotor B2M asociada a tejidos específicos.

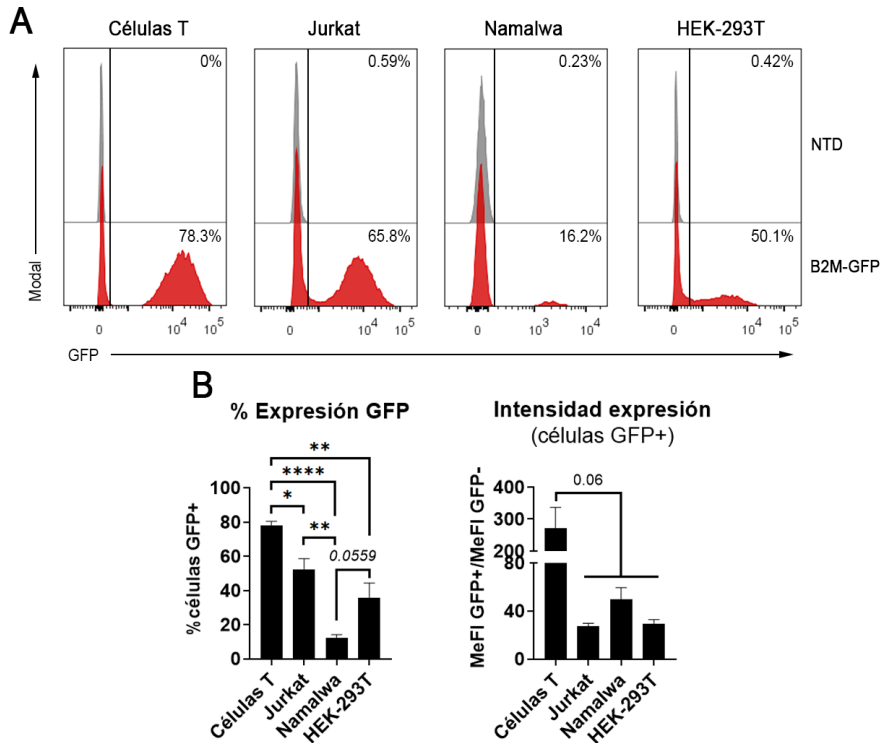


Figura 19. Expresión de GFP bajo el promotor B2M en distintos tipos celulares.

A) Histogramas representativos de la expresión de la expresión de GFP bajo el promotor B2M en células T primarias, Jurkat, Namalwa y HEK-293T. **B)** Gráficas que muestran el porcentaje de células GFP+ bajo el promotor B2M (**izquierda**), y la intensidad de expresión dentro de las células GFP+ (**derecha**) en los 4 tipos celulares descritos previamente (n=3). El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas, *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001.

Niveles de expresión. Otra particularidad en el uso de estos dos promotores, además de las mencionadas anteriormente, es la diferencia en la intensidad de expresión del transgén dependiendo del promotor utilizado. Aunque ambos promotores mantienen el control sobre la expresión de GFP, se observa una mayor intensidad de expresión del transgén cuando se utiliza el promotor B2M, con variaciones de expresión más significativas, en comparación con el

promotor CD4, que produce una expresión de GFP menos intensa y con variaciones prácticamente inexistentes (**Fig. 20A**).

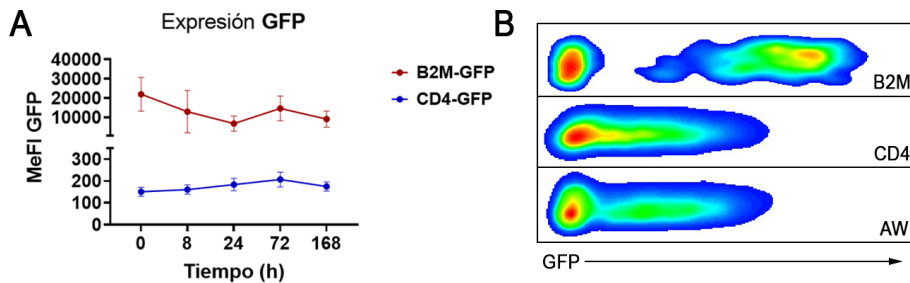


Figura 20. Intensidad de expresión de GFP bajo los promotores quiméricos.

A) Gráfica que muestra la intensidad de expresión de GFP bajo el promotor B2M (línea roja) y bajo el promotor CD4 (línea azul) en diferentes puntos temporales. B) *Dot-plots* representativos de la expresión de GFP bajo los promotores B2M, CD4 y AW a día 5 post-activación.

En resumen, los datos presentados sugieren que el promotor B2M podría ser un buen candidato para la expresión fisiológica del CAR, lo que potencialmente podría derivar en una terapia más segura. En comparación con el promotor AW ya publicado, el promotor B2M presenta un patrón de expresión similar, lo que aporta las ventajas de una expresión fisiológica, pero con una elevada intensidad de expresión a diferencia del AW (**Fig. 20B**). Por otro lado, el promotor CD4 puede ser útil para diversos usos, pues la expresión restringida a tejido abre la puerta a minimizar la expresión en células que no sean T, o incluso evitar la expresión del CAR en células empaquetadoras, lo que podría mejorar la producción de VLs-CAR.

2. Mejora de la actividad antitumoral de las células CAR-T19 mediante la expresión inducible de IL-18: células iTRUCK19.18

Como hemos comentado durante el manuscrito, el desarrollo de células CAR-T de 4ª generación abre la puerta a un incremento de eficacia de la terapia CAR-T en tumores sólidos, así como en leucemias o linfomas de alta agresividad que, aun a día de hoy, siguen presentando tasas elevadas de recaídas no solo tras los tratamientos convencionales, sino incluso tras la infusión de CARs comerciales.

Además, parece existir consenso en la necesidad de generar TRUCKs bajo una expresión inducible, pues esto parece imprescindible para no comprometer la seguridad del paciente sin perder la eficacia terapéutica necesaria para alcanzar el éxito clínico. La generación de TRUCKs inducibles sigue siendo un reto, pues tanto los sistemas basados en NFAT, como los sistemas de expresión inducible por doxiciclina con transactivadores pueden presentar problemas en la seguridad del paciente. Como alternativa, quisimos generar un TRUCK inducible (iTRUCK) basándonos en el sistema Lent-On-Plus (LOP), libre de transactivadores, para comprobar tanto su seguridad, como su eficacia en modelos de tumores líquidos y sólidos agresivos.

2.1. Generación de células CAR-T secretoras de IL-18 de forma inducible (iTRUCK19.18)

Como ha descrito nuestro grupo recientemente (Tristán-Manzano et al.), el sistema LOP es capaz de inducir transgenes en células T primarias *in vivo*, por lo que decidimos generar células T que expresaran IL-18 de manera inducible (células T iIL18) usando el sistema LOP. Clonamos la secuencia de IL-18 humana (ver M&M) en el vector LOP

con el objetivo de corroborar que la construcción funcionaba en células T primarias. Además, como control, también generamos células T que expresaban IL-18 de manera constitutiva (células T cIL18) (**Fig. 21A**). Transdujimos células T primarias con ambos vectores (**Fig. 21B**) y corroboramos la expresión de IL-18 (pro-péptido) mediante tinción intracelular por citometría de flujo. Los resultados mostraron que las células T cIL18 expresaban IL-18, mientras que las células T iIL18 solo expresaban la citoquina en presencia de dox. En ausencia de dox, los niveles de IL-18 fueron comparables a los de las células control no transducidas (**Fig. 21C**).

A continuación, comprobamos como afectaba la expresión de IL-18 a la biología de la célula T post-activación vía TCR (cuando la célula se ha activado dos veces: una para la transducción, se mantienen sin estímulo hasta que alcanza el estado basal, y se vuelven a activar para la realización del ensayo). No observamos que la expresión constitutiva o inducible de IL-18 alterara la tasa de proliferación de las células T (**Fig. 21D, izquierda**). Sin embargo, sí observamos una cierta tendencia a un incremento de las poblaciones $T_{naïve/SCM}$, T_{CM} y T_{EM} , aunque los cambios observados entre la condición con y sin inductor fueron mínimos (**Fig. 21D, centro**). En términos de la expresión de LAG3, sorprendentemente, las células T iIL18, en presencia o ausencia de dox, mostraron niveles menores (sin diferencia entre ellas) que las células T cIL18 (**Fig. 13D, derecha**).

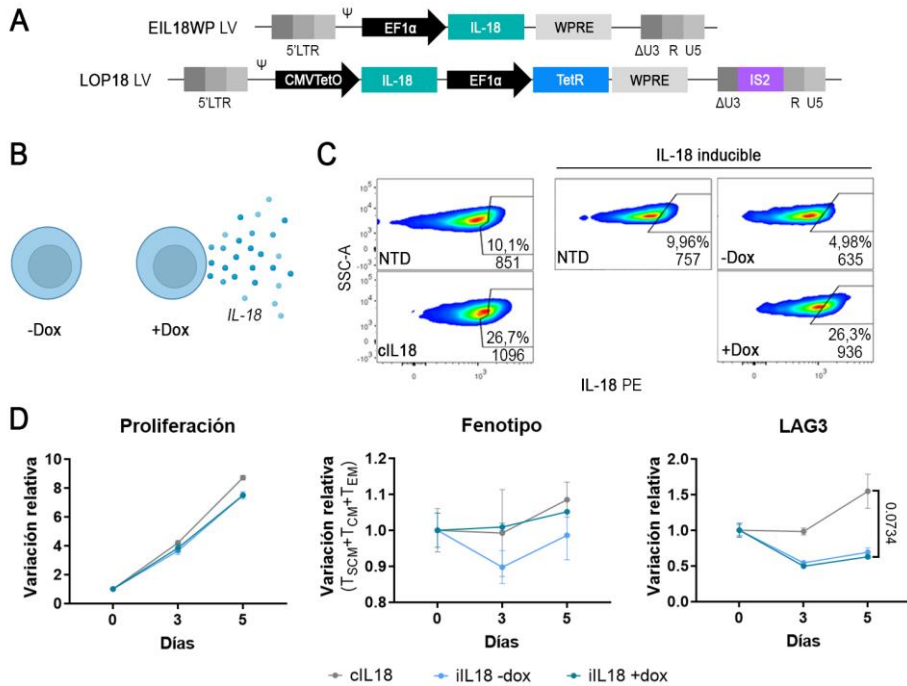


Figura 21. Generación de células T primarias productoras de IL-18 constitutivamente o de forma inducible.

A) Vectores lentivirales expresando IL-18 de manera constitutiva (EIL18WP, arriba) o inducible (LOP18, abajo). **B)** Esquema de una célula T primaria productora de IL-18 dependiente de dox. **C)** *Dot-plots* representativos de la expresión de IL-18 en células T primarias sin transducir (NTD, plot izquierda arriba), transducidas con EIL18WP LVs (cIL18, plot izquierda abajo) o transducidas con LOP18 e incubadas en ausencia (-Dox, plot derecha arriba) o presencia (+Dox, plot derecha abajo) de 50 ng/ml de doxiciclina (tinción intracelular por citometría de flujo). **D)** Gráficos que indican la variación en términos de proliferación celular (izquierda), variación de fenotipo memoria (centro) y variación en la expresión de LAG3 (derecha) (cIL18: n=3; iIL18 -dox: n=3; iIL18 +dox: n=3) tras activación vía TCR a tiempo 0. T-test pareado de dos colas.

NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas); cIL18: *constitutive IL-18* (IL-18 constitutiva); iIL18: *inducible IL-18* (IL-18 inducible); dox: doxiciclina.

Una vez comprobamos que el sistema LOP nos permitía controlar la expresión de IL-18 en células T primarias mediante dox, planteamos generar células iTRUCK19.18: células T que expresaran el CAR de manera constitutiva, pero que expresaran IL-18 de manera inducible. Para ello, combinamos dos VLs: respecto al CAR, utilizamos el CAR clínico ARI-0001, un CAR α CD19 con un scFv propio (A3B1), 4-1BB como

dominio coestimulador y CD3 ζ como dominio de señalización, expresado bajo el promotor EF1 α (**Fig. 22A, superior**); por otro lado, usamos el sistema LOP para inducir IL-18 (**Fig. 22A, inferior**).

Para generar las células iTRUCK19.18, utilizamos el método de co-transducción. Mezclamos los VLs ARI y los VLs LOP18 y transdujimos células T primarias (MOI 3 para CAR, MOI 5 para LOP18) (**Fig. 14B**). Este método generó una población heterogénea de células doble positivas, doble negativas y positivas para cada marcador. En general, la co-transducción con dos VLs redujo la expresión del CAR en comparación con la transducción solo con VLs ARI, siendo aproximadamente la mitad de la expresión (**Fig. 22C**), pero no pareció influir en la expresión de IL-18 (**Fig. 22D**). Al agregar dox, se indujo significativamente la expresión de IL-18 en todos los donantes analizados (n=15, 10 donantes independientes). Sin embargo, observamos un cierto *leaking* en células transducidas en ausencia de inductor en algunos donantes (**Fig. 22E**).

Una vez confirmamos que nuestras células iTRUCK19.18 expresan IL-18 de manera dependiente de dox, quisimos verificar que la citoquina se procesa y secreta correctamente. La IL-18 se produce como un pro péptido y, ante una señal de activación o daño tisular que provoque el procesamiento de la pro-caspasa 1 a caspasa 1 funcional por el complejo del inflamosoma, esta última convierte la pro-IL-18 en IL-18, que luego se secreta. Nuestros resultados concuerdan con este mecanismo, ya que detectamos la secreción de IL-18 por nuestras células iTRUCK19.18 solo al agregar dox y activarlas con TransAct o PMA, mientras que no observamos secreción de IL-18 cuando las células iTRUCK19.18 no se activaron (**Fig. 22F**).

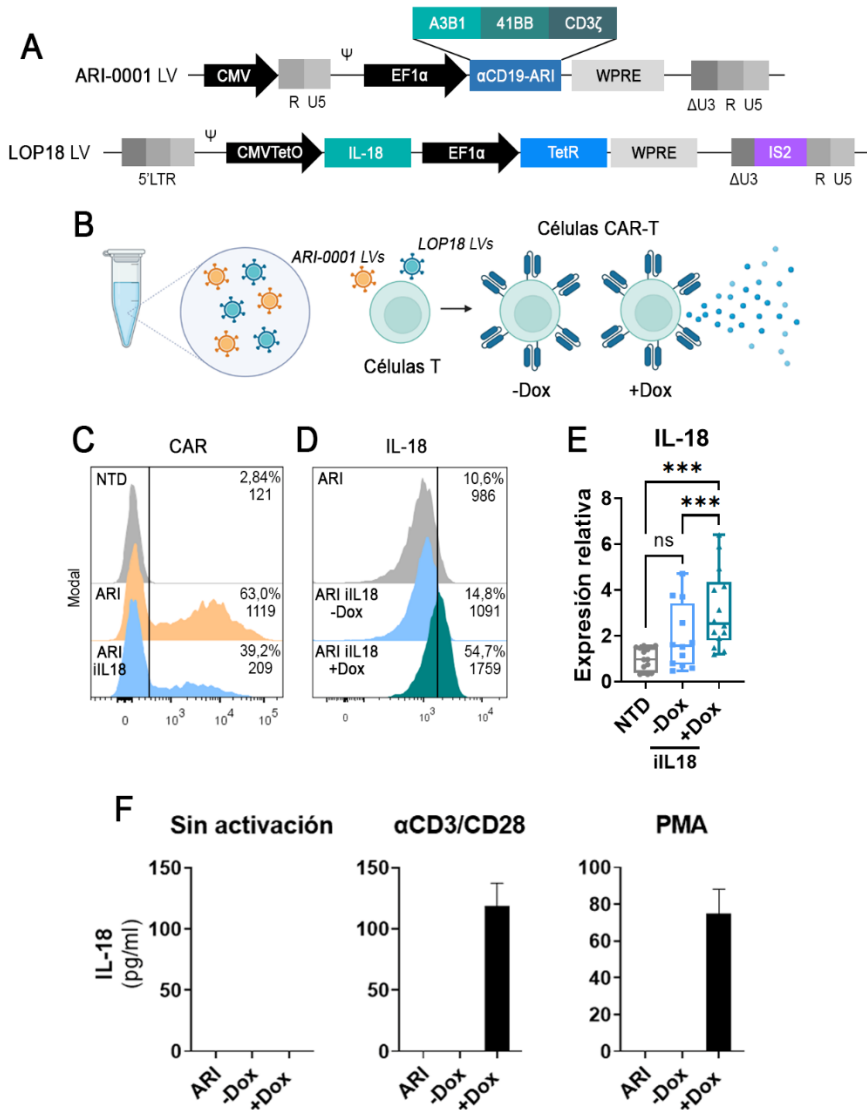


Figura 22. Generación de células CAR-T productoras de IL-18 de manera inducible (iTRUCK19.18).

A) Vectores lentivirales codificantes para el CAR de segunda generación ARI-0001 (arriba) y para el sistema LOP codificante para IL-18 (abajo). **B)** Esquema del proceso de co-transducción para la generación de las células iTRUCK19.18. **C)** Histogramas representativos de la expresión del CAR en células sin transducir (arriba) en ARI CAR-T (en medio) y en iTRUCK19.18 (abajo). **D)** Histogramas representativos de la expresión de IL18 intracelular en células ARI CAR-T (arriba) y en células iTRUCK19.18 en ausencia (en medio) o presencia (abajo) de 50 ng/ml de doxiciclina. **E)** Expresión de IL-18 de células iTRUCK19.18 relativa a la expresión basal de células sin transducir (n=15, 10 donantes independientes). **F)** Detección de IL-18 secretada por las células iTRUCK19.18 sin activación (izquierda), activando con TransAct (en medio) y

con PMA (derecha) (n=2, 2 donantes independientes). El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas, ***p<0,001.

LVs: *lentiviral vectors* (vectores lentivirales); NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas); ns: no significativo; PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*.

La detección del pro-péptido reveló cierto *leaking* de la condición sin inductor, algo que no se reflejó en la secreción. Esto puede deberse a dos motivos: en primer lugar, la tinción intracelular utiliza un anticuerpo dirigido a la pro-forma de IL-18, por lo que es posible que no haya un procesamiento completo de toda la pro-IL18, algo que podría explicar por qué no se detecta ni una mínima cantidad de IL-18 secretada en la condición -dox; por otra parte, es probable que la cantidad mínima secretada de IL-18 en la condición -dox no sea suficiente para alcanzar el umbral de detección del método utilizado para cuantificar la secreción.

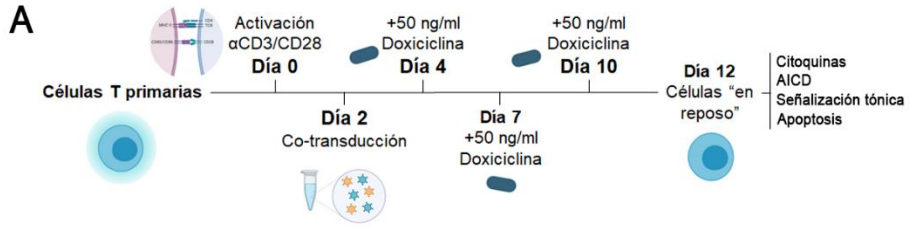
2.2. Caracterización de las células iTRUCK19.18

Tras la generación de nuestras células iTRUCK19.18, realizamos una caracterización más amplia de las mismas, para comprobar qué parámetros de las células CAR-T se veían modificados por la inducción de IL-18.

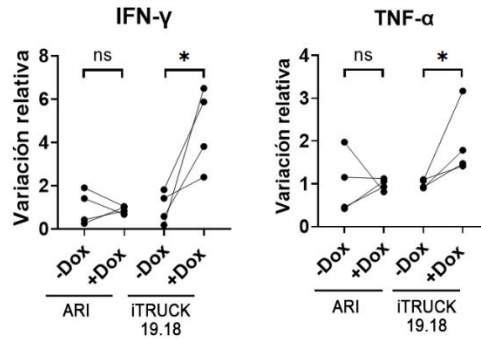
La adición de Dox a las células iTRUCK19.18 incrementó la producción de citoquinas proinflamatorias, de marcadores de AICD y señalización tónica sin afectar a la apoptosis celular.

A continuación, generamos el “producto de infusión” mediante la co-transducción de células T primarias para producir las células iTRUCK19.18, y luego expandimos las células hasta que alcanzaron un estado de reposo (10 días post-activación). En este estado se midió la producción de dos citoquinas pro-inflamatorias, marcadores relacionados con la muerte inducida por activación, señalización tónica y apoptosis (**Fig. 23A**).

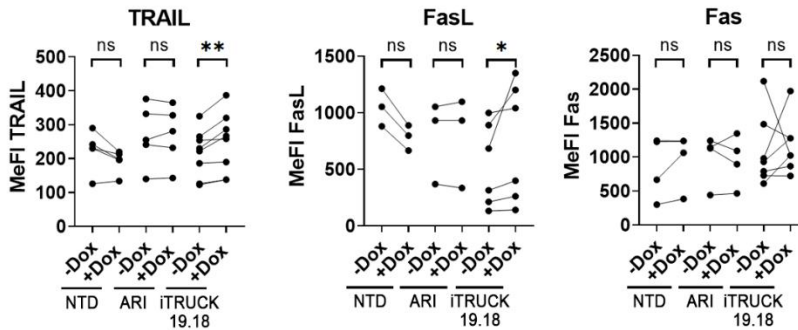
- **Citoquinas pro-inflamatorias:** uno de los roles de IL-18 es estimular la actividad antitumoral de las células T, estimulando la liberación de citoquinas proinflamatorias, principalmente IFN γ , así como TNF α . En la **Fig. 23B** se puede observar que las células iTRUCK19.18 aumentaron la producción de ambas citoquinas cuando se suministró dox y se produjo IL-18, a diferencia de los controles de células CAR-T (ARI) en presencia o ausencia de dox.
- **Muerte inducida por activación (AICD):** para evaluar el efecto de la inducción de IL-18 en la muerte inducida por activación, medimos la expresión de TRAIL, FasL y Fas, marcadores relacionados con la activación y muerte celular, en células T y células ARI con y sin dox, y células iTRUCK19.18 con y sin dox. Observamos que la liberación de IL-18 dependiente de dox indujo un aumento significativo en la expresión de TRAIL y FasL, efectos que no se observaron en los controles de células T y CAR-T (**Fig. 23C, gráficas izquierda y central**). A pesar de los cambios en la expresión de FasL, paradójicamente, no se observaron cambios en la expresión de Fas por la presencia de IL-18. (**Fig. 23C, gráfica derecha**).
- **Señalización tónica:** otro parámetro medido fue la señalización tónica del CAR, a través de la fosforilación de CD3 ζ . Observamos que la expresión de IL-18 incrementó significativamente la señalización tónica, algo que no ocurrió por el efecto de la dox en células CAR-T (**Fig. 23D**).
- **Apoptosis:** en términos de muerte por apoptosis, no se observaron diferencias en células iTRUCK19.18 con o sin dox (**Fig. 23E**).



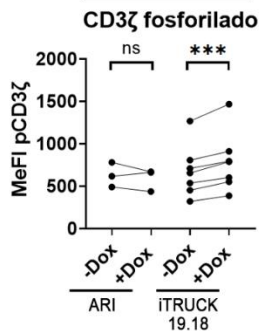
B Citoquinas pro-inflamatorias



C Muerte inducida por activación (AICD)



D Señalización tónica



E Apoptosis

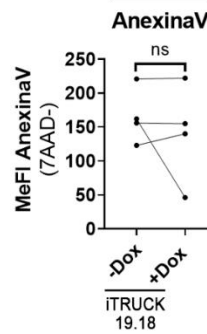


Figura 23. Caracterización de las células iTRUCK19.18 tras su producción.

A) Esquema del procedimiento experimental para la generación de las células ARI e iTRUCK19.18 y el análisis en estado basal. **B)** Producción de IFN γ (izquierda) y TNF α (derecha) de las células ARI e iTRUCK19.18 en ausencia y presencia de dox (n=4). **C)** Expresión de marcadores de muerte celular inducida por activación: TRAIL (izquierda) (NTD y ARI: n=5; iTRUCK19.18: n=7), FasL (medio) (NTD y ARI: n=3; iTRUCK19.18: n=6) y Fas (derecha) (NTD y ARI: n=3; iTRUCK19.18: n=7). **D)** Medición de la señalización tónica (pCD3 ζ) de las células ARI e iTRUCK19.18 en ausencia y presencia de dox (ARI: n=3; iTRUCK19.18: n=7). **E)** Medición de la apoptosis de las células iTRUCK19.18 en ausencia y presencia de dox (n=4). Cada n implica un donante independiente. La cantidad de dox usada en todas las condiciones fue 50 ng/ml. Todos los experimentos se realizaron con células T en estado basal. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

IFN γ : interferón gamma; TNF α : tumor necrosis factor alpha (factor de necrosis tumoral alfa); AICD: *activation-induced cell death* (muerte celular inducida por activación); ns: no significativo.

En resumen, en ausencia de activación, la administración de doxiciclina incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias en las células iTRUCK19.18, aunque también la AICD y la señalización tónica. Sin embargo, la modificación de estos parámetros de manera dox-dependiente no influyó en un incremento de la apoptosis de las células iTRUCK19.18.

La adición de Dox a las células iTRUCK19.18 en estado basal y durante su activación incrementa diferentes marcadores de activación sin afectar al fenotipo.

Además del estudio de los parámetros a nivel basal (sin activación), quisimos realizar una caracterización más profunda del estado fenotípico y funcional de las células iTRUCK19.18 no solo a nivel basal, sino también tras una estimulación antigénica a tiempo corto, para poder observar el papel de IL-18 cuando la célula CAR-T presenta diferentes estados metabólicos. Para ello, generamos el producto de

infusión de igual manera que en el caso anterior, además de estudiar los diferentes parámetros 4 horas post activación vía TCR (**Fig. 24A**).

A nivel fenotípico, no se observaron diferencias entre las células iTRUCK19.18 y los controles de células ARI en cuanto a la presencia o ausencia de IL-18, y la mayoría de las células T se encontraban en un estadio memoria. La proporción de células CD4/CD8 tampoco mostró diferencias significativas, siendo mayoritaria la población CD8+ (**Fig. 24B**). Tras 4 horas de estimulación antigénica vía TCR, no se observaron diferencias a nivel fenotípico, aunque, lógicamente, la mayoría de las células presentaron un fenotipo efector. La presencia de IL-18 a nivel basal y tras una breve estimulación antigénica vía TCR no pareció afectar al estado fenotípico de las células T (**Fig. 24C**).

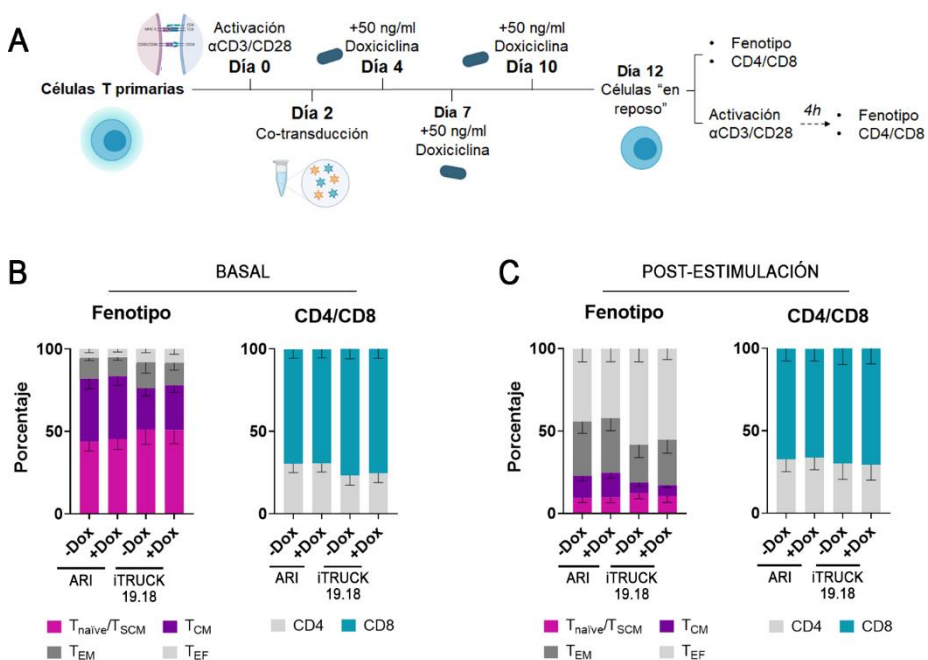


Figura 24. Caracterización fenotípica de las subpoblaciones de las células ARI e iTRUCK19.18 con y sin dox en estado basal y tras activación.

A) Esquema que refleja el procedimiento experimental. **B)** Fenotipo y proporción CD4/CD8 de células ARI e iTRUCK19.18 con y sin dox en estado

basal (n=7, 6 donantes independientes). **C)** Fenotipo y proporción CD4/CD8 de células ARI e iTRUCK19.18 con y sin dox tras 4 horas de activación vía TCR (n=4, 4 donantes independientes).

T_{SCM} : *stem memory T cells* (células T troncales memoria); T_{CM} : *central memory T cells* (células T memoria central); T_{EM} : *effector memory T cells* (células T efectoras memoria); T_{EF} : *effector T cells* (células T efectoras).

En estudios previos, hemos observado que la presencia de IL-18 tiene cierto efecto en la activación de las células T a nivel basal, pero no conduce a una aceleración hacia un fenotipo efector terminal en células T. Para confirmar el aumento del estado de activación de las células T debido a la presencia de IL-18, hemos estudiado tres marcadores directamente asociados con la activación celular, tanto a nivel basal como después de una activación corta: IFN γ , Granzima B e IL-2. Hemos observado que, tanto a nivel basal como 4 horas después de la activación, las células iTRUCK19.18 con dox presentan un mayor grado de activación, evidenciado por un aumento en el número de células que expresan 1, 2 y 3 marcadores de activación y una reducción significativa en el número de células que no expresan ningún marcador. Las mayores diferencias se observaron en el aumento de la expresión de IFN γ y Granzima B, mientras que el aumento en la expresión de IL-2 fue moderado. Además, las células ARI control no mostraron variaciones en presencia o ausencia de dox, lo que sugiere que la dox, al menos en la dosis utilizada, no tiene efecto en la activación (**Fig. 25**).

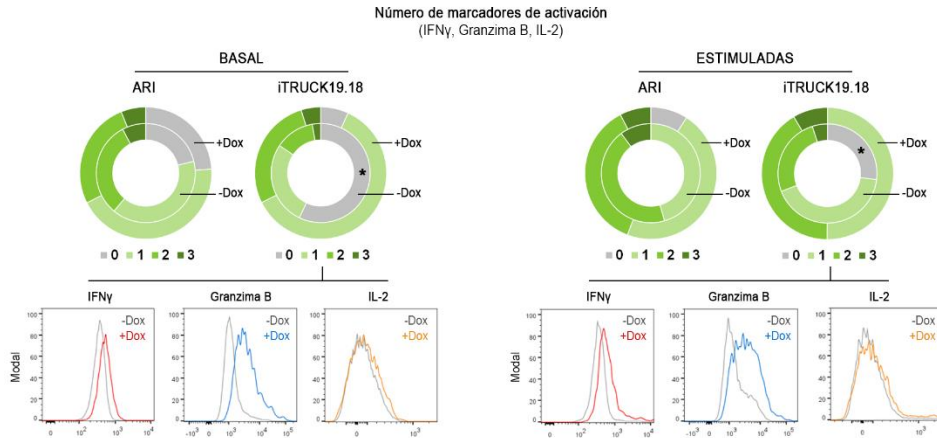


Figura 25. Caracterización de marcadores de activación de células ARI e iTRUCK19.18 en presencia y ausencia de dox.

Gráficos circulares que muestran la proporción de células ARI e iTRUCK19.18 con (círculos externos) y sin (círculos internos) doxiciclina (50 ng/ml) que expresan 0, 1, 2 o 3 marcadores (ver código de colores debajo de los gráficos) de activación (IFN γ , Granzima B e IL-2) en estado basal (izquierda) y tras 4 horas de activación vía TCR (derecha). Histogramas representativos de los niveles de expresión de IFN γ , Granzima B e IL-2 en células iTRUCK19.18 en ausencia (gris) y presencia (rojo, azul, naranja) de doxiciclina se muestran tanto para estado basal (izquierda) como tras activación (derecha) (n=4, 4 donantes independientes). El análisis estadístico se basa en un test ANOVA de dos colas, *p<0,05.

IFN γ : interferón gamma.

Una vez que comprobamos que la producción de IL-18 por las células CAR-T aumentaba el grado de activación tanto a nivel basal como post-activación, evaluamos el efecto que esto tenía sobre el agotamiento celular. Para ello, medimos la expresión de tres marcadores clásicos asociados al agotamiento de las células T: PD1, LAG3 y TIM3. Sin embargo, no observamos diferencias en la expresión de estos marcadores al añadir dox y detonar la producción de IL-18 por las células iTRUCK19.18, tanto en estado basal como tras activación (**Fig. 26**). Además, corroboramos la ausencia de efecto asociado al uso de dox en este rango de dosis (**Fig. 25, 26, datos ARI**). Por lo tanto, concluimos que este aumento en la activación de las células

iTRUCK19.18 no derivó en un estado de agotamiento funcional de las mismas.

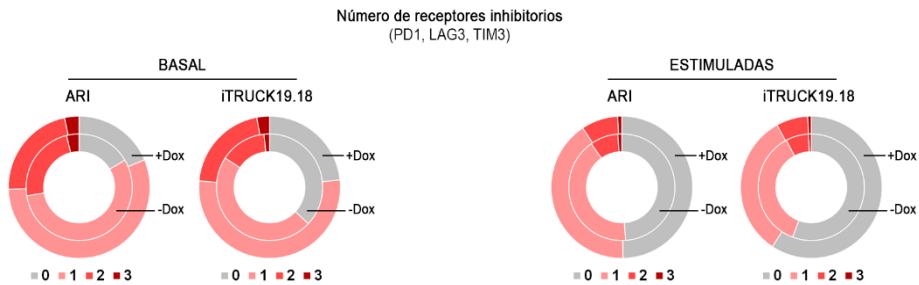


Figura 26. Expresión de los receptores inhibitorios de células ARI e iTRUCK19.18 en estado basal y tras activación.

Gráficos circulares que muestran la proporción de células ARI e iTRUCK19.18 con (círculos externos) y sin (círculos internos) dox (50 ng/ml) que expresan 0, 1, 2 o 3 receptores inhibitorios (PD1, LAG3 y TIM3) (ver código de colores debajo de las gráficas) en estado basal (izquierda) y tras 4 horas de activación vía TCR (derecha) (n=4, 4 donantes independientes).

2.3.Efecto de la inducción de IL-18 en la polarización de macrófagos

El TME ha supuesto una de las principales barreras en la eficacia clínica de la terapia CAR-T frente a tumores sólidos, así como frente a determinadas neoplasias hematológicas, donde la terapia no ha generado resultados tan positivos. Uno de los principales actores en el TME son los macrófagos asociados a tumor, que son macrófagos con fenotipo M2 que presentan un fuerte papel inmunosupresor, limitando la acción de las células CAR-T.

En algunos estudios se ha demostrado que la expresión de IL-18 transgénica por células CAR-T ha reducido la cantidad de macrófagos M2 en modelos murinos (Chmielewski & Abken, 2017). Por lo tanto, queríamos investigar si el control de la expresión de IL-18 también nos permitiría controlar la polarización de los macrófagos humanos M2

protumorales a macrófagos M1 antitumorales. Para ello, aislamos células T de sangre periférica de donantes sanos y las transducimos para generar células iTRUCK19.18. Simultáneamente, enriquecimos el cultivo de monocitos que se diferenciaron a macrófagos primarios humanos tras su adherencia a plástico (24h post-aislamiento), los cultivamos durante 6 días con medio de diferenciación M0 (M-CSF) y 24h antes del co-cultivo con las células T, los polarizamos a un fenotipo M2 (**Fig. 27A**) con IL-4. Usamos CD206 para identificar macrófagos M2 y CD11c (CD206-) para identificar macrófagos M1 (**Fig. 27B**). Los resultados mostraron que la liberación de IL-18 dependiente de dox indujo una reducción en el porcentaje de macrófagos M2 y un aumento en el de macrófagos M1, mientras que con las células sin dox no se detectaron variaciones (**Fig. 27C, D**). Estos resultados demuestran la bioactividad de la IL-18 secretada y sugieren que el control de la expresión de IL-18 podría permitir la remodelación parcial del TME por parte de las células iTRUCK19.18.

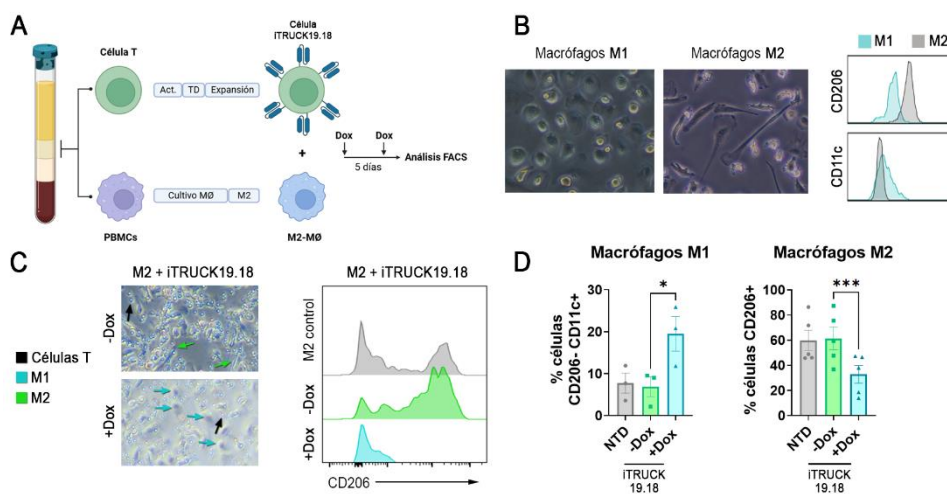


Figura 27. La adición de doxiciclina a las iTRUCK19.18 produce la polarización de macrófagos primarios humanos hacia un fenotipo M1.

A) Esquema del procedimiento experimental. **B)** Imágenes de microscopía de campo claro de macrófagos humanos polarizados a un fenotipo M1 o M2, con

los histogramas correspondientes a la expresión de CD206 y CD11c, que nos permiten identificar las poblaciones por citometría de flujo. **C)** Imágenes de microscopía de campo claro del co-cultivo de macrófagos con células iTRUCK19.18 (izquierda) e histograma representativo de la expresión de CD206 en macrófagos cuando se cocultivaron con células iTRUCK19.18 (derecha). **D)** Proporción de macrófagos M1 y M2 cuando se cocultivaron con células NTD, con células iTRUCK19.18 sin dox y con dox (50 ng/ml) (M1: n=3, 3 donantes independientes; M2: n=5, 3 donantes independientes). El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas, *p<0,05; ***p<0,001.

NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas).

Además, evaluamos cómo la liberación de IL-18 afectaba al estado de las células iTRUCK19.18 en presencia de macrófagos. A nivel de fenotipo, detectamos que las células iTRUCK19.18 con dox presentaron un fenotipo menos diferenciado (una mayor proporción de células $T_{naïve/SCM}$ y T_{CM}) en comparación con las células sin dox (**Fig. 28A**), mientras que no observamos diferencias a nivel de agotamiento, pues no vimos diferencias en la expresión de PD1 ni de TIM3 (**Fig. 28B**). Por otra parte, corroboramos que la inducción de IL-18 en este entorno también supuso un incremento dox-dependiente en la producción de IFN γ y TNF α (**Fig. 28C**).

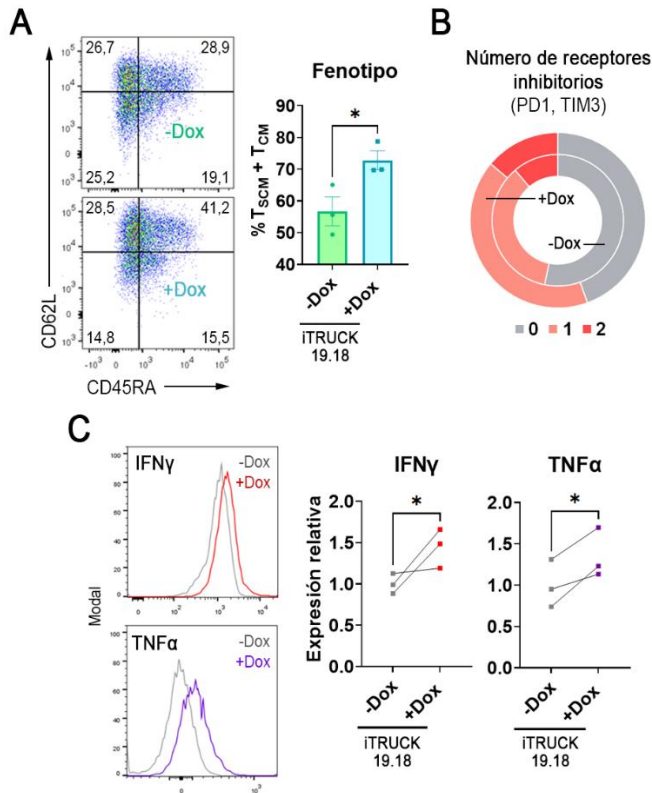


Figura 28. Efecto de la adición de dox sobre las células iTRUCK19.18 en co-cultivo con macrófagos.

A) Proporción de células T_{naïve/SCM} y T_{CM} de las células iTRUCK19.18 en presencia de macrófagos con y sin dox, medida por los marcadores CD45RA y CD62L (n=3, 3 donantes independientes). **B)** Gráfico circular que muestra la proporción de células iTRUCK19.18 expresando 0, 1 o 2 receptores inhibitorios (PD1 y TIM3) con (círculos externos) y sin (círculos internos) (n=3, 3 donantes independientes). **C)** Expresión de IFN γ y TNF α de las células iTRUCK19.18 en co-cultivo con macrófagos con y sin dox (n=3, 3 donantes independientes). La cantidad de dox usada fue de 50 ng/ml. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de una cola, *p<0,05.

T_{SCM}: stem cell T cells (células T troncales memoria); T_{CM}: central memory T cells (células T memoria central); IFN γ : interferón gamma; TNF α : tumor necrosis factor alpha (factor de necrosis tumoral alfa).

2.4. Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en un modelo de linfoma de Burkitt en presencia de Dox

Tras comprobar que la liberación de IL-18 por parte de las células iTRUCK19.18 aumentaba su estado de activación celular, determinamos si esto se traducía en un incremento de la actividad citotóxica. Para ello, realizamos un co-cultivo de células iTRUCK19.18 (que habían sido expandidas en ausencia de dox) y células CAR-T de referencia (ARI-0001) con células Namalwa, un modelo celular de linfoma de Burkitt, en una proporción E:D 1:10. Añadimos dox en el momento del co-cultivo y llevamos a cabo varias re-estimulaciones con células tumorales para maximizar las diferencias en lisis tumoral (**Fig. 29A**). Los resultados demostraron que, en el tercer encuentro tumoral, las células iTRUCK19.18 que liberaban IL-18 aumentaron significativamente la actividad antitumoral en comparación con las células sin dox y con las células estándar. Además, la condición sin dox mostró una acción antitumoral mayor que las células ARI, lo que sugiere la existencia de cierto *leaking* de IL-18, o al menos durante los primeros días (algo que puede llegar a ser beneficioso). Desde el segundo encuentro, las células ARI no fueron capaces de controlar la proliferación tumoral (**Fig. 29B**).

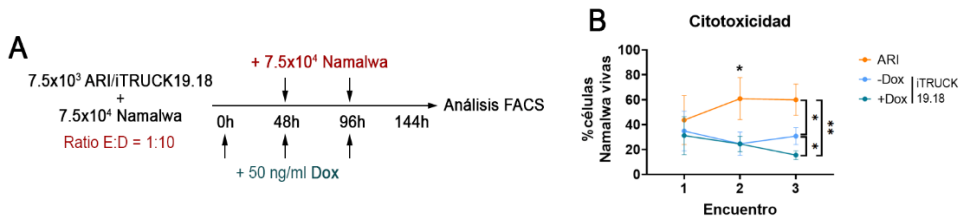


Figura 29. Estudio de la citotoxicidad de las células iTRUCK19.18 frente a células tumorales Namalwa *in vitro*.

A) Esquema del procedimiento experimental del ensayo de citotoxicidad. **B)** Gráfica que muestra el % de células Namalwa vivas tras los diferentes encuentros tumorales con las células ARI o iTRUCK19.18 sin y con dox (50 ng/ml, administrada inicialmente a tiempo 0), así como las células ARI (n=4, 4 donantes independientes). El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de una cola, *p<0,05; **p<0,01.

A continuación, evaluamos la eficacia de las células iTRUCK19.18 *in vivo*. Para ello, infundimos 0.3x10⁶ células Namalwa en ratones inmunodeprimidos y, 3 días después, infundimos 1x10⁶ células iTRUCK19.18 vía intravenosa. Utilizamos dox (1000 ng/ml) diluida en el agua de los ratones para inducir la expresión de IL-18 y monitoreamos la progresión tumoral mediante bioluminiscencia. Además, debido a la fuerte acción antitumoral obtenida, realizamos dos re-infusiones tumorales adicionales a los mismos ratones (**Fig. 30A**).

Para confirmar la inducción de IL-18, se analizaron las células T en la sangre de los ratones a los 7 días después de la infusión. Se observó un aumento significativo de las células T circulantes en los ratones tratados con dox (**Fig. 30B, izquierda**). Además, se confirmó la inducción de la expresión de IL-18 en comparación con los ratones que no recibieron dox (**Fig. 30B, derecha**).

Los ratones fueron sacrificados bien por una alta señal bioluminiscente o bien por presentar síntomas de EICH. En este punto final, se analizaron distintos órganos, y en todos ellos se observó una tendencia

a una mayor expresión de IL-18 en los ratones tratados con dox que, pese a no ser tan clara como en sangre a día 7, se mantuvo en todos los órganos analizados (bazo, médula ósea, cerebro y sangre) (**Fig. 30C**).

Además de la presencia de IL-18, también se analizó la cantidad de células tumorales en diferentes órganos (**Fig. 30D**). La potencia antitumoral fue muy elevada, ya que prácticamente no se encontraron células tumorales en los órganos de los ratones tratados con CAR-T, excepto en el cerebro, donde en algunos ratones tratados con la condición estándar (ARI) se detectaron células tumorales.

Estos resultados demuestran la capacidad de nuestras células iTRUCK19.18 para controlar la expresión *in vivo* de IL-18 a través del sistema LOP. La respuesta antitumoral fue muy elevada incluso tras dos re-inoculaciones tumorales, pues ninguno de los ratones tratados con CAR-T (condiciones ARI, iTRUCK19.18 sin y con dox) fueron sacrificados por presentar linfoma, a diferencia de las dos condiciones control (PBS y NTD), que presentaron una rápida progresión tumoral (**Fig. 30E**). Los ratones tratados con CAR-T fueron sacrificados por presentar síntomas de EICH, que no pareció incrementarse por la acción de IL-18. En resumen, el sistema LOP permite controlar la expresión IL-18 en células CAR-T *in vivo* sin comprometer la supervivencia de los ratones (**Fig. 30F**).

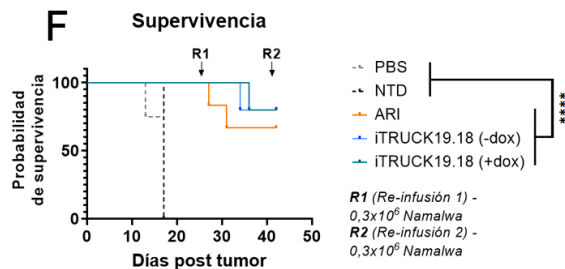
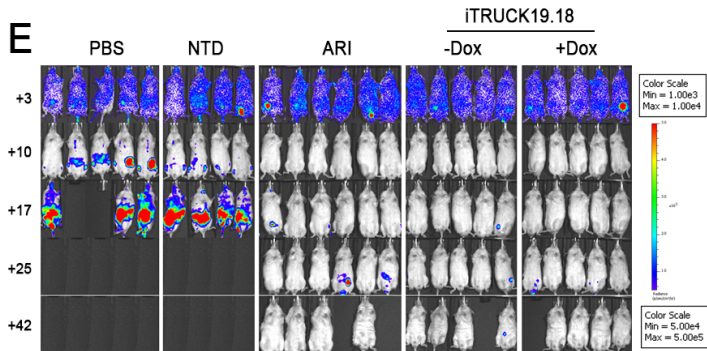
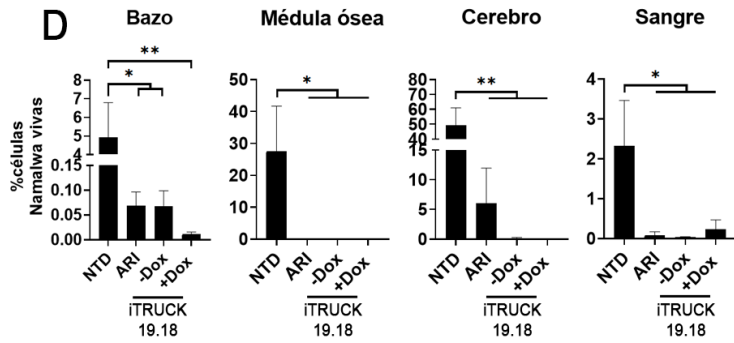
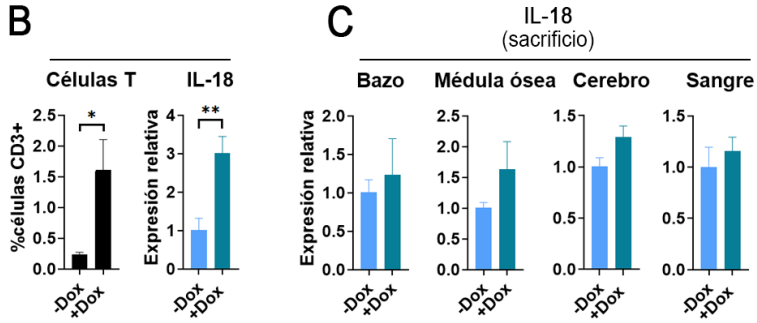
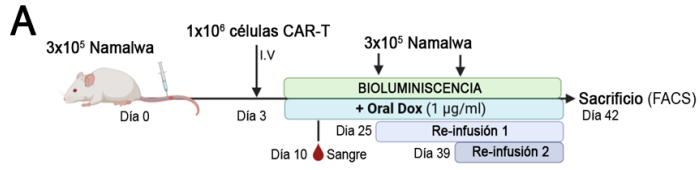


Figura 30. Expresión de IL-18 a través del sistema LOP en células iTRUCK19.18 sin y con doxyciclina *in vivo* y estudio de la eficacia antitumoral.

A) Esquema que representa el procedimiento experimental. **B)** Proporción de células T humanas (izquierda) y expresión relativa de IL-18 (derecha) por las células T obtenidas de sangre a los 7 días de la infusión de las células iTRUCK19.18. **C)** Gráficas que muestran la expresión relativa de IL-18 por las células iTRUCK19.18 con dox respecto a las homónimas sin dox a punto final del experimento en diferentes órganos (bazo, médula ósea, cerebro y sangre). **D)** Gráficas que muestran la proporción de células tumorales (Namalwa) vivas en diferentes órganos (bazo, médula ósea, cerebro y sangre) de los ratones tratados con NTD, ARI, iTRUCK19.18 sin y con dox, en el momento del sacrificio de los ratones. **E)** Imágenes por bioluminiscencia de la progresión tumoral de los ratones tratados con PBS, NTD, ARI e iTRUCK19.18 sin y con dox. **F)** Gráfica que muestra la supervivencia de los ratones a lo largo del tiempo de los ratones tratados con PBS, NTD, ARI e iTRUCK19.18 sin y con dox. La expresión relativa de IL-18 se calculó dividiendo el % células hCD3+IL18+ en la condición +dox dividido entre el % células hCD3+IL18+ en la condición -dox. En las gráficas que muestran la expresión relativa de IL-18 se consideraron las muestras que presentaron >100 eventos en la región hCD3+. La doxyciclina (1000 ng/ml) fue suministrada 2 veces a la semana diluida en agua (PBS: N=5; NTD: N=4; ARI: N=6; iTRUCK19.18 -dox: N=5; iTRUCK19.18 +dox: N=5). Los análisis estadísticos se basan en T-test no pareado de dos colas (B), de una cola (D) y en el test Log-Rank (F), en todos los casos *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001.

Dox: doxyciclina; PBS: *phosphate-buffered saline* (tampón fosfato salino); NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas).

A continuación, se diseñó un nuevo experimento para analizar si la inducción de IL-18 dependiente de dox en las iTRUCK19.18 se traducía en un incremento de la actividad antitumoral. Para ello, realizamos un test de estrés donde infundimos la misma cantidad de células Namalwa que en el experimento previo, pero esta vez, infundimos una cantidad sub-terapéutica de células iTRUCK19.18 ($0,3 \times 10^6$ células/ratón) a los 6 días de la infusión tumoral (3 días más que el experimento estándar). Finalizamos el experimento en el mismo punto temporal y comprobamos que las células iTRUCK19.18 que producían IL-18 (con dox) mostraron una mayor eficacia antitumoral en comparación con las células no inducidas y las células ARI (**Fig. 31A, B**).

Después del sacrificio de los ratones, se evaluó la presencia de células tumorales y células T infiltradas en el bazo y la médula ósea. En el bazo, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de células tumorales en los ratones tratados con CAR-T (**Fig. 31C, izquierda**), mientras que en la médula ósea se observó una disminución en la cantidad de células tumorales en los ratones tratados con células iTRUCK19.18 que producían IL-18 (**Fig. 31C, derecha**). En ambos órganos, el grupo tratado con dox presentó una tendencia a una mayor cantidad de células T (**Fig. 31D**).

Además, mediante citometría de flujo, se analizó el estado de las células T recuperadas después del sacrificio. En el bazo de los ratones tratados con células iTRUCK19.18 +dox, se observó que las células T infiltradas presentaban un fenotipo menos diferenciado (**Fig. 31E, izquierda**), lo que podría haber contribuido a la mayor potencia antitumoral. Asimismo, estas células mostraron una tendencia a presentar una mayor expresión de LAG3 (**Fig. 31E, centro**) y TIM3 (**Fig. 31E, derecha**). En la médula ósea, sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al fenotipo o la expresión de TIM3 de los ratones infundidos con CAR-T (**Fig. 31F**). No obstante, las células ARI presentaron una tendencia a una menor expresión de LAG3 (**Fig. 31F, centro**)

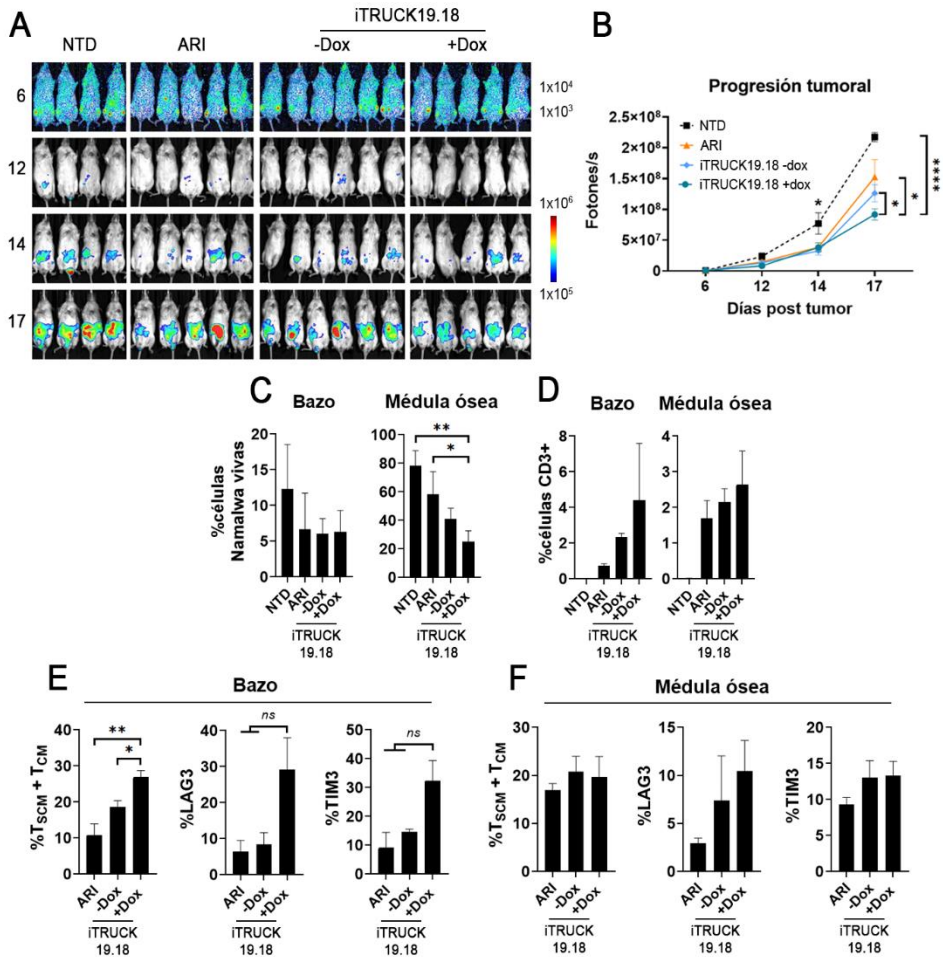


Figura 31. Eficacia antitumoral y caracterización de las células iTRUCK19.18 *in vivo*.

A) Imágenes por bioluminiscencia de la progresión tumoral de los diferentes grupos experimentales (NTD, ARI, iTRUCK19.18 -dox y +dox). **B)** Cuantificación de los fotones/segundo para la progresión tumoral de los diferentes grupos experimentales. **C)** Gráficas que muestran la proporción de células tumorales (Namalwa) vivas en el momento del sacrificio en bazo (izquierda) y médula ósea (derecha). **D)** Gráficas que muestran la proporción de células T humanas vivas en el momento del sacrificio en bazo (izquierda) y médula ósea (derecha). **E)** Gráficas que muestran la proporción de células T_{naïve/SCM} y T_{CM} (izquierda), la proporción de células LAG3+ (medio) y TIM3+ (derecha) en el bazo en el momento del sacrificio. **F)** Gráficas que muestran la proporción de células T_{naïve/SCM} y T_{CM} (izquierda), la proporción de células LAG3+ (medio) y TIM3+ (derecha) en la médula ósea en el momento del sacrificio. La doxiciiclina (500 ng/ml) se suministró 2 veces a la semana disuelta en agua (NTD: N=4; ARI: N=5; iTRUCK19.18 -dox: N=6; iTRUCK19.18 +dox: N=5). El análisis estadístico se basa en T-test no pareado de dos colas (B) y de una cola (C y E), en ambos casos *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001.

Dox: doxiciclina; NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas); T_{SCM}: *stem cell T cells* (células T troncales memoria); T_{CM}: *central memory T cells* (células T memoria central).

2.5. Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en tumores B primarios en presencia de Dox

Una vez comprobamos que la producción de IL-18 por células CAR-T suponía un incremento en la acción antitumoral frente a un modelo de linfoma de Burkitt, quisimos validar el uso de células iTRUCK19.18 en tumores primarios de la estirpe B. Para ello, seleccionamos células B tumorales de dos pacientes con neoplasias B, uno con un linfoma de zona marginal (LZM) con expresión periférica y otro con leucemia linfocítica crónica sin tratamiento, y las enfrentamos a células iTRUCK19.18 generadas a partir de células T primarias de 3 donantes sanos independientes. Utilizamos 3 *ratios* efector:diana y realizamos la lectura por citometría de flujo 13 horas después del co-cultivo (**Fig. 32A**). Las muestras de ambos pacientes presentaban una menor expresión de CD19 y CD21 en comparación con las células Namalwa (**Fig. 32B**). Los resultados reflejaron que, en los tumores de ambos pacientes, la lisis específica fue significativamente mayor cuando las células iTRUCK19.18 liberaban IL-18 (líneas azules) en comparación con las células sin dox (líneas grises), en el *ratio* más restrictivo (**Fig. 32C**).

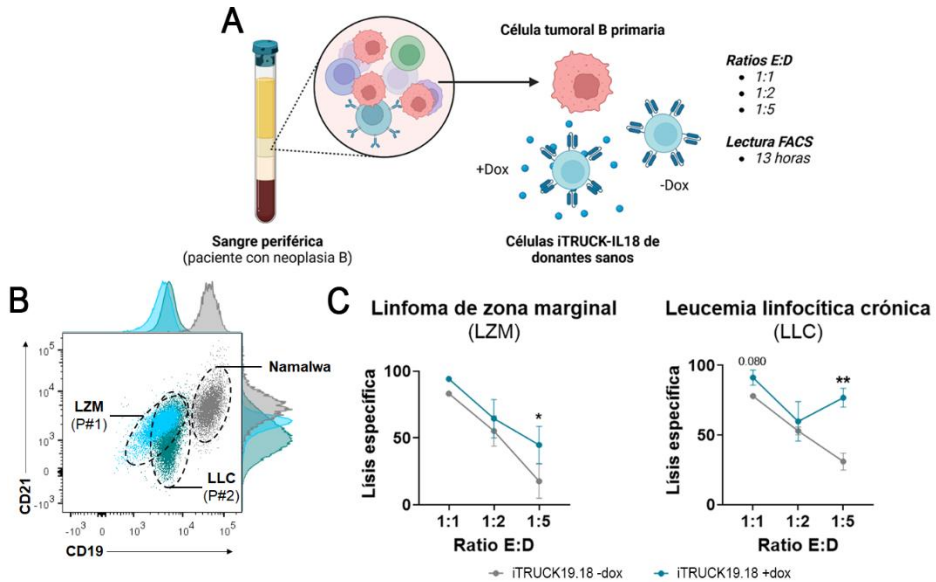


Figura 32. Estudio de la citotoxicidad de las células iTRUCK19.18 de donantes sanos frente a tumores B primarios.

A) Dibujo que indica el procedimiento experimental. **B)** *Dot-plot* e histogramas que indican la expresión de CD19 y CD21 de las dos muestras tumorales primarias y de las células Namalwa. **C)** Cuantificación de la lisis específica (calculada en base a las células CD19+) de las células iTRUCK19.18 con y sin dox frente a diferentes proporciones de una muestra tumoral primaria de LZM leucemizado (**izquierda**) y de una muestra tumoral primaria de LLC (**derecha**) (n=3, 3 donantes independientes). El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas, *p<0,05; **p<0,01.

Dox: doxiciclina; LZM: linfoma de zona marginal; LLC: leucemia linfocítica crónica.

Generación de iTRUCK19.18 a partir muestras de pacientes.

Con la intención de evaluar la capacidad de modificar las células T del propio paciente y su funcionalidad, aislamos los linfocitos T de la muestra de sangre periférica del paciente con LZM leucemizado, activamos y co-transducimos para generar células iTRUCK19.18 que después enfrentaremos al propio tumor B del paciente. (**Fig. 33A**).

Los resultados de transducción de células T demostraron que la co-transducción para generar células iTRUCK19.18 a partir de células T primarias de paciente es factible, obteniendo aproximadamente un 20% de células CAR+ y un 10% de células IL18+ (**Fig. 33B**). Además, los experimentos de citotoxicidad confirmaron la eficacia de las células iTRUCK19.18 con dox, que dejaron un menor número de células tumorales CD19+ vivas (**Fig. 33C**). Estos hallazgos refuerzan el potencial terapéutico de las células iTRUCK19.18 para el tratamiento de neoplasias hematológicas B.

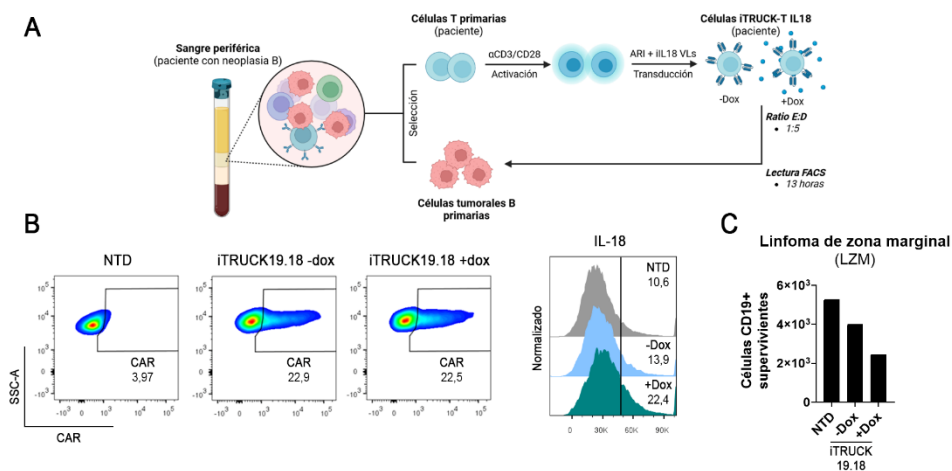


Figura 33. Estudio de la capacidad citotóxica de células iTRUCK19.18 generadas a partir de células T de paciente frente a su propio tumor primario.

A) Dibujo que indica el procedimiento experimental seguido para la generación de células iTRUCK19.18 de paciente y enfrentamiento contra su propio tumor. **B)** *Dot-plots* que indican la transducción de células T de paciente con LZM con VLS-CAR (izquierda, células NTD; centro, iTRUCK19.18 -dox; derecha, iTRUCK19.18 +dox), e histogramas que indican la expresión de IL-18 en las mismas células (gris, células NTD; azul, iTRUCK19.18 -dox; verde, iTRUCK19.18 +dox). **C)** Gráfica que muestra las células CD19+ tumorales vivas tras el encuentro tumoral contra las células iTRUCK19.18 generadas a partir de células T del paciente, con un *ratio* E:D 1:5, y la lectura por citometría de flujo tras 13 horas del co-cultivo. La cantidad de doxiciclina usada fue 50 ng/ml.

NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas).

En conclusión, los datos muestran que el control de la expresión de IL-18 por células CAR-T permiten controlar la potencia citotóxica de las mismas frente a modelos celulares, murinos y tumores primarios de pacientes con neoplasias hematológicas de linaje B.

2.6. Generación de un modelo de adenocarcinoma pancreático metastásico CD19+

En base a los resultados obtenidos aplicando las células iTRUCK19.18 a modelos de cánceres líquidos, quisimos aplicar el sistema LOP18 para potenciar la terapia CAR-T frente a tumores sólidos. Debido a que el objetivo es validar la prueba de concepto del sistema en diferentes tipos tumorales, decidimos no cambiar el CAR, para mantener las mismas condiciones, por lo que generamos un modelo de tumor sólido al cual sobreexpresamos CD19, para que fuese susceptible a ser reconocido por el CAR ARI-0001. Utilizamos células MIA PaCa2, un modelo de adenocarcinoma pancreático ductal altamente complejo debido a mutaciones en KRAS y TP53, y una sobreexpresión de marcadores de CSCs, lo que lo hace muy agresivo y altamente metastásico *in vivo* (Gradiz et al., 2016).

Para generar el modelo, partimos de células MIA PaCa2 que expresaban GFP (para la detección celular en los experimentos *in vitro*) y nanoluciferasa (para la detección *in vivo*), previamente generadas en el laboratorio, y las transdujimos con un VL que contenía CD19 completo bajo el promotor EF1 α . Las células transducidas expresaron alrededor del 30% de CD19, las cuales se sortearon posteriormente para alcanzar un nivel de expresión del 70% (**Fig. 34A**) (Tristán-Manzano et al., 2022), con expresión antigénica heterogénea, algo común en tumores sólidos, con el objetivo de crear un modelo que se asemejara más a la realidad.

A continuación, evaluamos si la sobreexpresión de CD19 afectó algunos parámetros indicativos de agresividad. En primer lugar, analizamos la expresión de CD44 y CD133, marcadores de *stemness* en células tumorales asociados con la presencia de CSCs, y no se encontraron variaciones significativas, con niveles muy elevados de CD44 y bajos de CD133 en ambos casos (**Fig. 34B**). Además, se observó una alta expresión de IFN γ R en membrana (**Fig. 34C**), lo que se ha descrito como crucial en tumores sólidos para la sensibilidad a las células CAR-T, a diferencia de los tumores líquidos (Larson et al., 2022). Curiosamente, la sobreexpresión de CD19 también se correlacionó con una sobreexpresión de PD-L1 en las células MIA PaCa2 (**Fig. 34C, D**), lo que potencialmente podría aumentar aún más la agresividad del modelo debido a la acción inmunosupresora generada por la interacción del eje PD1/PD-L1.

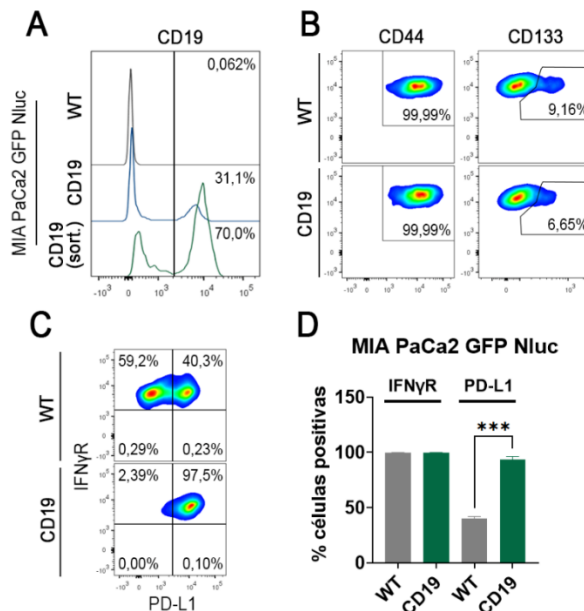


Figura 34. Generación de un modelo celular de adenocarcinoma pancreático sobreexpresando CD19.

A) Histogramas que indican la sobreexpresión de CD19 en células MIA PaCa2 GFP Nluc antes y después del *sorting*. **B)** *Dot-plots* que muestran la expresión

de CD44 y CD133 en células WT y células que sobreexpresan CD19 tras el *sorting*. **C)** *Dot-plots* representativos que muestran la expresión de IFN γ R y PD-L1 en células WT y células que sobreexpresan CD19 tras el *sorting*. **D)** Proporción de células tumorales que expresan los dos marcadores anteriores (n=4). El análisis estadístico se basa en un T-test no pareado de dos colas, ***p<0,001.

WT: *wild-type* (fenotipo silvestre); IFN γ R: *interferon gamma receptor* (receptor del interferon gamma).

Con el fin de evaluar si las modificaciones en las células MIA PaCa2 afectaban a la progresión tumoral, generamos un modelo murino en el que comparamos las células WT con las células CD19+. Para simular con mayor precisión la realidad de un tumor pancreático en un paciente, optamos por generar un modelo ortotópico en colaboración con el grupo del Dr. Marchal, a pesar de la complejidad técnica del procedimiento. El proceso quirúrgico consistió en la implantación ortotópica de las células MIA PaCa2 embebidas en matrigel mediante una pequeña escisión en la piel y en la capa muscular, seguida de la infusión del complejo células-matrigel en la cola del páncreas, y las posteriores suturas y colocación de grapas quirúrgicas. Luego, realizamos el seguimiento por bioluminiscencia y controlando el peso de los animales (**Fig. 35A**). Es importante destacar que la cirugía es un procedimiento complejo que involucra la anestesia inhalada de los ratones, seguida de un período de reposo y recuperación (**Fig. 35B**).

No se observaron diferencias en la progresión tumoral (**Fig. 35C, D**) ni cambios significativos en el peso (**Fig. 35E**) asociados a la expresión de CD19 en el modelo ortotópico generado. Para validar la expresión de CD19 en los tumores sólidos desarrollados, se rescataron los tumores primarios del páncreas de los ratones en el momento del sacrificio, se procesaron (**Fig. 35F**) y se analizaron mediante citometría de flujo,

observando que la expresión de CD19 se mantenía estable en los tumores sólidos (**Fig. 35G**).

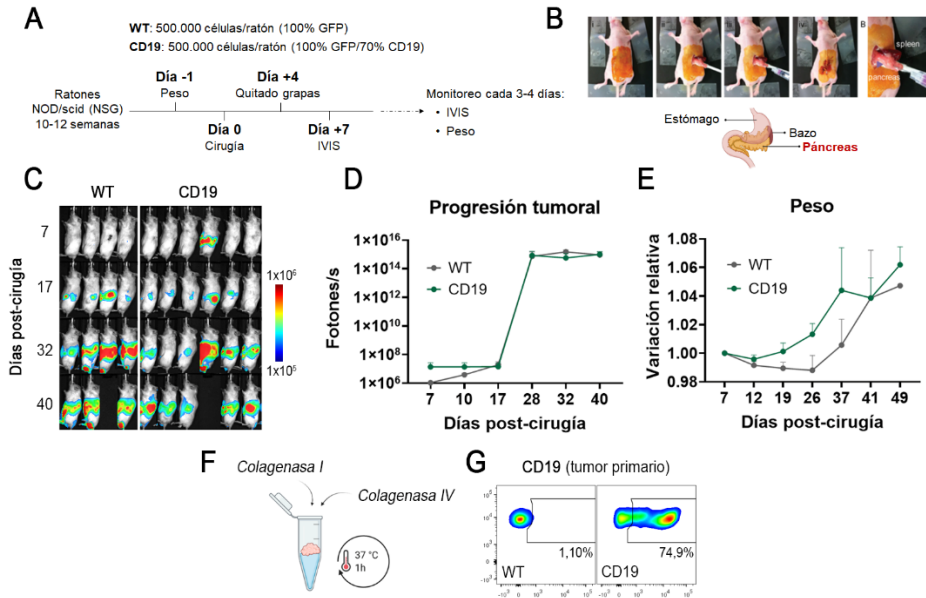


Figura 35. Generación de un modelo ortotópico de tumor pancreático CD19+.

A) Esquema que indica el procedimiento experimental. **B)** Ilustraciones que indican el proceso quirúrgico del implante tumoral en el páncreas (Chai et al., 2013). **C)** Imágenes de bioluminiscencia de la progresión tumoral de los ratones con tumores WT y con tumores CD19+. **D)** Evolución de la progresión tumoral de los ratones con tumores WT y con tumores CD19+. **E)** Variación de peso de los ratones con tumores WT y CD19+. **F)** Dibujo que indica el mecanismo de procesamiento de los tumores sólidos extraídos. **G)** Dot-plots que indican la expresión de CD19 de un tumor rescatado tras el sacrificio (WT: n=4; CD19: n=6).

WT: *wild-type* (fenotipo silvestre).

En conjunto, los datos indicaron que la expresión de CD19 no confirió una desventaja ni una ventaja selectiva a las células tumorales para su progresión tumoral *in vivo*.

2.7. Incremento de la actividad antitumoral de las células iTRUCK19.18 en un modelo de adenocarcinoma pancreático metastásico

Tras generar el modelo de tumor sólido con expresión heterogénea de CD19, evaluamos si el control de la expresión de IL-18 permitía controlar la acción antitumoral de las células iTRUCK19.18 en este modelo *in vitro*. Para ello, diseñamos un esquema experimental similar al del experimento anterior, con algunas modificaciones. En este caso, añadimos doxiciclina para inducir la expresión de IL-18 y realizamos cuatro encuentros tumorales, añadiendo células tumorales sobre las mismas células CAR-T cada 48 horas, para corroborar la persistencia de las células iTRUCK19.18 (**Fig. 36A**).

Los resultados mostraron un incremento significativo de la potencia antitumoral de las células iTRUCK19.18 con dox con respecto a las células sin dox en todos los encuentros tumorales analizados (**Fig. 36B**). Esto fue de la mano del mantenimiento de un fenotipo menos diferenciado desde el segundo encuentro (**Fig. 36C**) por parte de las células productoras de IL-18, así como una retención del agotamiento celular (**Fig. 36D**). El mantenimiento de las poblaciones T memoria se ha correlacionado con una mejor respuesta antitumoral en pacientes tratados con CAR-T, por lo que los resultados obtenidos respecto al mantenimiento del fenotipo y a la retención del agotamiento celular apoyan el incremento de la acción citotóxica de las células iTRUCK19.18 secretoras de IL-18.

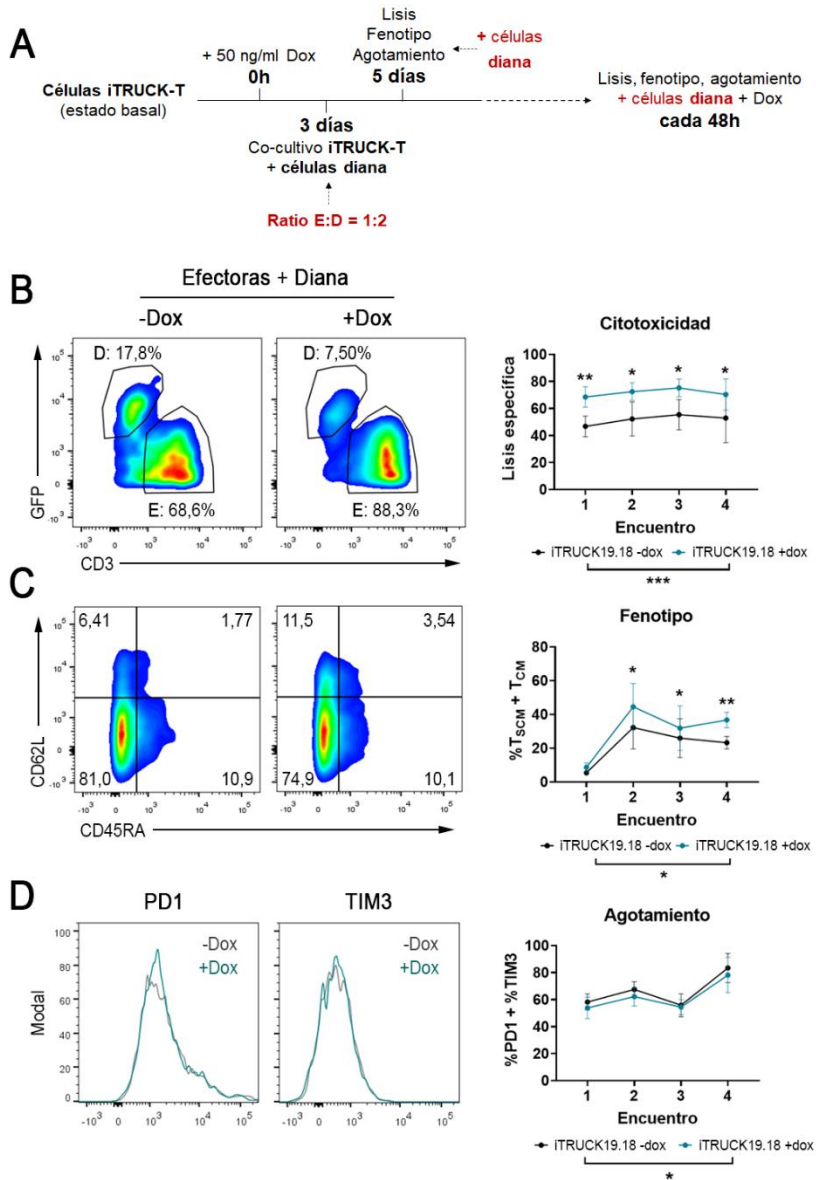


Figura 36. Estudio comparativo de la capacidad citotóxica de las células iTRUCK19.18 con y sin dox frente a células MIA PaCa2.

A) Esquema del procedimiento experimental para el ensayo de citotoxicidad. **B)** *Dot-plots* representativos de la lisis de las células iTRUCK19.18 con y sin dox del primer encuentro, y gráfica cuantificando la lisis específica durante 4 encuentros tumorales. **C)** *Dot-plots* representativos del fenotipo de las células iTRUCK19.18 con y sin dox, y gráfica cuantificando el fenotipo durante 4 encuentros tumorales. **D)** Histogramas representativos de la expresión de PD1 y TIM3 en las células iTRUCK19.18 con y sin dox, y gráfica cuantificando la expresión de ambos marcadores durante 4 encuentros tumorales (n=5, 5

donantes independientes). La cantidad de doxiciclina usada fue 50 ng/ml. El análisis estadístico se basa en un T-test pareado de dos colas y en un test ANOVA dos colas, para ambos * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

T_{SCM}: *stem memory T cells* (células T troncales memoria); T_{CM}: *central memory T cells* (células T memoria central).

Finalmente, basándonos en los resultados obtenidos *in vitro*, evaluamos la actividad antitumoral *in vivo* de las células iTRUCK19.18 en el mismo modelo MIA PaCa2 CD19+ de tumor sólido agresivo, implantado ortotópicamente, con la intención de crear un entorno hostil y heterogéneo para las células CAR-T y así maximizar las diferencias entre los grupos experimentales.

Tras 7 días después de la cirugía de implante, se infundieron 2×10^6 células CAR-T/ratón (**Fig. 37A**) y se realizó un seguimiento mediante bioluminiscencia (**Fig. 37B**). A pesar de que todas las células CAR-T de los diferentes grupos experimentales mostraron una fuerte respuesta antitumoral, eliminando prácticamente todas las células tumorales en el páncreas (verificado mediante citometría de flujo al momento del sacrificio), no se observaron diferencias notorias entre los grupos tratados con CAR-T (**Fig. 37C**). No obstante, es importante destacar que los ratones tratados con células iTRUCK19.18 con dox fueron los únicos en los que no se encontraron células tumorales vivas en el páncreas ni en ninguno de los órganos después del sacrificio (**Fig. 37D**). Lamentablemente, algunos ratones desarrollaron una fuerte EICH, lo que obligó a finalizar el experimento prematuramente.

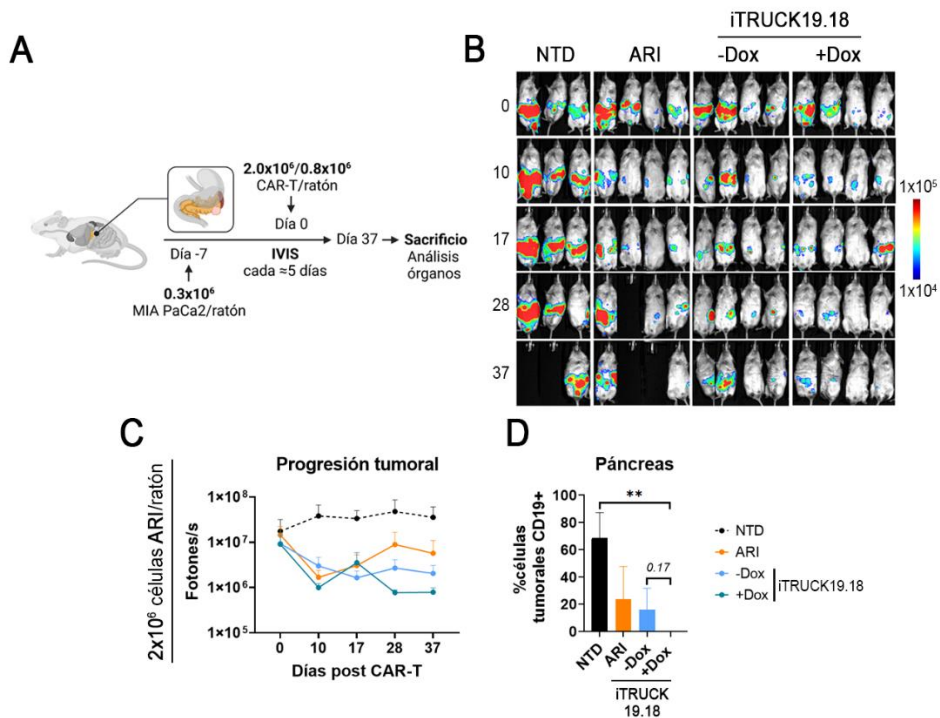


Figura 37. Estudio de la eficacia de las células iTRUCK19.18 en un modelo ortotópico de tumor sólido *in vivo*.

A) Esquema que refleja el procedimiento experimental de implante del tumor e infusión de las células CAR-T. **B)** Imágenes de bioluminiscencia de la progresión tumoral de los ratones de los diferentes grupos experimentales (NTD, ARI, iTRUCK19.18 sin y con dox). **C)** Gráfica que muestra la progresión tumoral medida en fotones/segundo de los diferentes grupos. **D)** Gráfica que muestra el porcentaje de células tumorales CD19+ vivas en el páncreas en el momento del sacrificio. El código de colores indicado en la leyenda se mantiene en toda la figura. La doxiciclina (500 ng/ml) se administró dos veces a la semana diluida en agua (NTD: n=3; ARI: n=4; iTRUCK19.18 -dox: n=4; iTRUCK19.18 +dox: n=4). El análisis estadístico se basa en un T-test no pareado de dos colas, **p<0,01.

NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas).

Después del sacrificio, evaluamos la infiltración de linfocitos T en el tumor (páncreas) y en órganos extratumorales (bazo, médula ósea, hígado y pulmones). Los resultados indicaron una mayor presencia de células ARI en el tumor, hígado y pulmones en comparación con las

células iTRUCK19.18 con y sin dox. Aunque no alcanzó significancia estadística, la tendencia en bazo y médula ósea fue similar (**Fig. 38A**).

Posteriormente, evaluamos el fenotipo de las células T infiltradas en el tumor (páncreas) y en los diferentes órganos extratumorales analizados. Encontramos una tendencia a un fenotipo menos diferenciado en las células iTRUCK19.18 con dox en hígado, pulmones y el tumor, mientras que no se observó una correlación clara en bazo ni médula ósea (**Fig. 38B**). Sin embargo, las células iTRUCK19.18 presentaron una tendencia a niveles más bajos de LAG3 y TIM3 en el bazo y médula ósea, sin notables diferencias entre la condición con y sin dox en médula ósea. Lo mismo se observó en los niveles de LAG3 en el tumor (**Fig. 38C**).

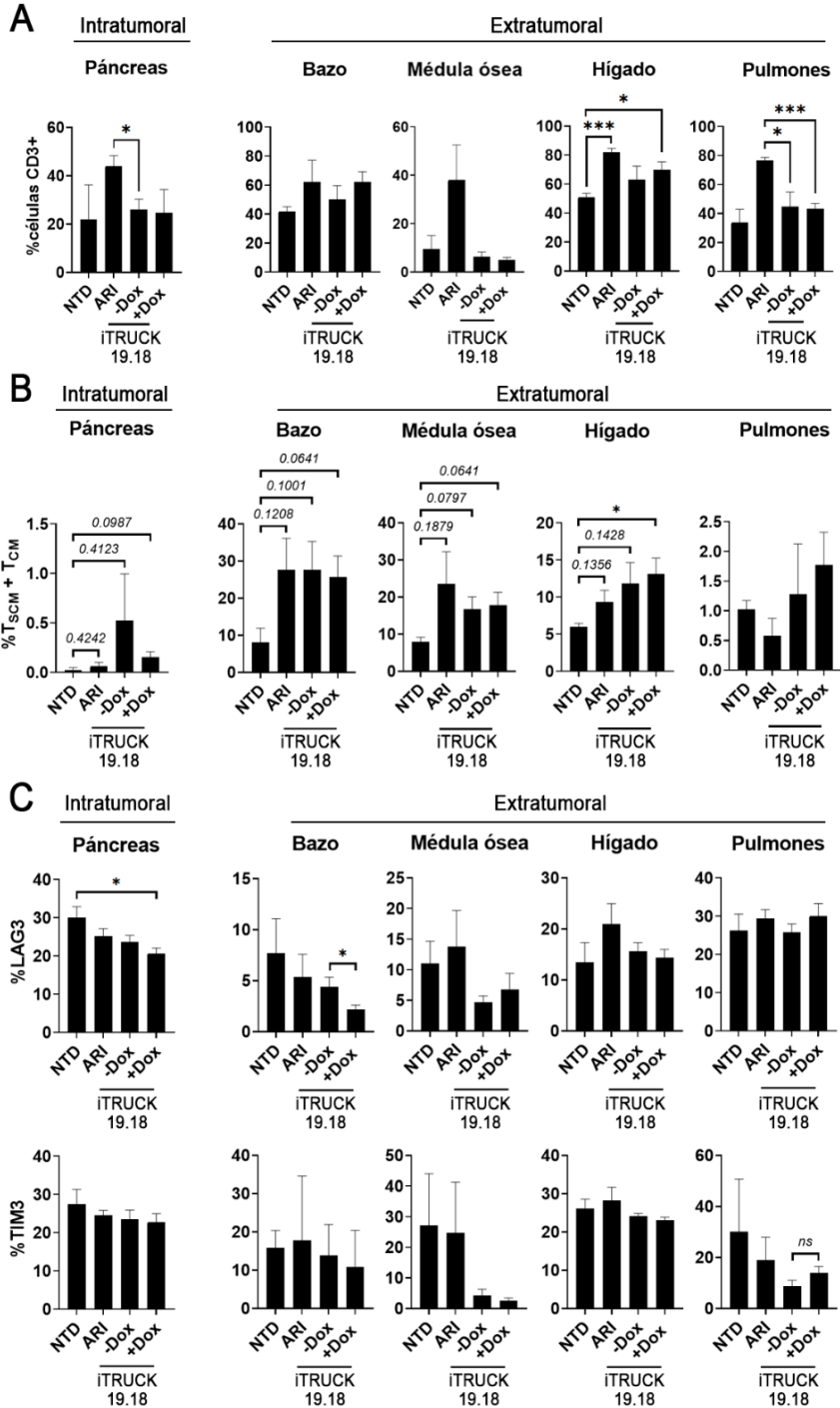


Figura 38. Caracterización de las células T infiltradas en el tumor y en diversos órganos extratumorales.

A) Las gráficas muestran la proporción de células T humanas infiltradas en el páncreas, bazo, médula ósea, hígado y pulmones de los ratones pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. **B)** Las gráficas muestran la proporción de células $T_{naive/SCM}$ y T_{CM} en el páncreas, bazo, médula ósea, hígado y pulmones de los ratones pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. **C)** Las gráficas muestran la proporción de células T que expresan LAG3 (arriba) y TIM3 (abajo) en el páncreas, bazo, médula ósea, hígado y pulmones de los ratones pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. En los apartados B, C y D se consideraron las muestras que presentaron >100 eventos en la región hCD3+ (NTD: n=3; ARI: n=4; iTRUCK19.18 -dox: n=4; iTRUCK19.18 +dox: n=4). En análisis estadístico se basa en un T-test no pareado de dos colas, *p<0,05; ***p<0,001.

Dox: doxiciclina; NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas); T_{SCM} : *stem memory T cells* (células T troncales memoria); T_{CM} : *central memory T cells* (células T memoria central); ns: no significativo.

Con el objetivo de encontrar diferencias significativas en presencia de dox y de combinar las dos estrategias seguidas en esta tesis para mejorar las células CAR-T (expresión fisiológica del CAR y expresión regulada por dox), se llevó a cabo un test de estrés utilizando el promotor AW para expresar el CAR (AWARI). De esta manera el iTRUCK generado (iTRUCKAW19.18) expresará el CAR de forma fisiológica e IL-18 de forma inducible. En este experimento, además, se redujo la cantidad de células CAR-T infundidas (0.8×10^6 células/ratón). En estas condiciones, ninguna de las células CAR-T pudieron controlar la progresión tumoral en ninguno de los grupos (**Fig. 39A**), pero solo en los ratones tratados con iTRUCKAW19.18 con dox se redujo en un 50% la proporción de células tumorales CD19+ del tumor del páncreas en comparación con todos los demás grupos (**Fig. 39B**).

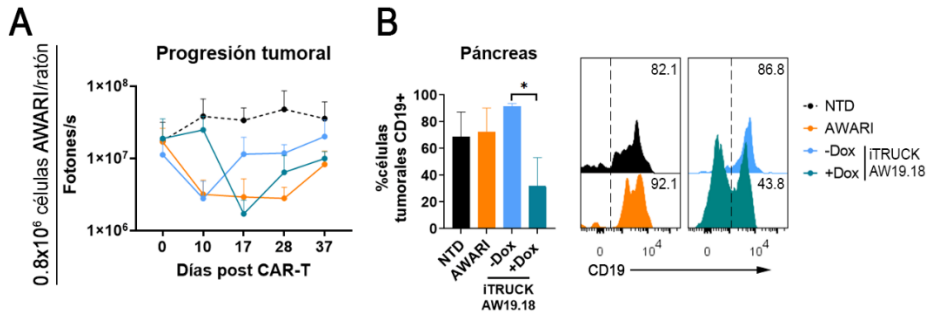


Figura 39. Estudio de la eficacia de las células iTRUCKAW19.18 en un modelo ortotópico de tumor sólido *in vivo*.

A) Gráfica que muestra la progresión tumoral medida en fotones/segundo de los diferentes grupos. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de células tumorales CD19+ vivas en el páncreas en el momento del sacrificio (**izquierda**), e histogramas representativos de los niveles de CD19 expresados por las células tumorales extraídas del páncreas (**derecha**). El código de colores indicado en la leyenda se mantiene en toda la figura. La doxiciclina (500 ng/ml) se administró dos veces a la semana diluida en agua (NTD: n=3; AWARI: n=4; iTRUCKAW19.18 -dox: n=4; iTRUCKAW19.18 +dox: n=4). El análisis estadístico se basa en un T-test no pareado de dos colas, * $p < 0,05$.

NTD: *non-transduced cells* (células no transducidas).

Así, estos datos en su conjunto corroboran la aplicación terapéutica de LOP en células CAR-T para el tratamiento de diferentes tipos tumorales mediante el control exógeno por doxiciclina de la IL-18. Este incremento antitumoral está limitado por la falta de representación de los componentes del TME tanto *in vitro* como en modelos murinos inmunodeprimidos, careciendo de poblaciones inmunitarias humanas donde la IL-18 juega un papel clave en la de la modulación del entorno inmunitario, pudiendo potenciar mucho más ese efecto antitumoral.

3. Generación de células empaquetadoras más eficientes para la producción de VLs

Ya desde el principio de la tesis habíamos observado la dificultad de producir VLs LOP y algunos VLs expresando CARs con la eficacia deseada. En general, la producción de los VLs se ve afectada por varios factores, como el tamaño del vector, las secuencias que incluye, así como por el GOI, que se expresará también en las células empaquetadoras. En el caso del LOP afecta más el tamaño y las secuencias incluidas, mientras que, en el CAR, parece afectarse sobre todo por el GOI (CAR). En concreto, cuando se producen VLs que codifican para genes cuyas proteínas tienen una elevada bioactividad o funciones citolíticas, las células empaquetadoras pueden verse afectadas (Bandaranayake & Almo, 2014). La producción de VLs implica la transfección del plásmido de interés, lo que lleva a la expresión génica en las células empaquetadoras. Además, las células empaquetadoras sufren la transducción celular con los propios VLs, lo que podría incrementar aún más la toxicidad si el GOI es tóxico, afectando negativamente al título de los VLs. El CAR es un ejemplo de proteína con una función biológica muy potente, pero que también puede ser considerada tóxica debido a su propia naturaleza, por lo que su sobreexpresión en las células empaquetadoras puede reducir la viabilidad/actividad metabólica, disminuyendo el título viral.

Dada la importancia de reducir la toxicidad del proceso de transfección y de los potenciales GOIs tóxicos para obtener títulos altos de VLs, se procedió a la modificación de las células empaquetadoras para que sean más resistentes a la apoptosis celular.

Los genes BAX y BAK, miembros de la familia de Bcl-2, son reguladores principales de la vía intrínseca de la apoptosis. Después de la

estimulación, estas proteínas se oligomerizan en la membrana mitocondrial externa para facilitar su permeabilización, lo que se considera un paso crucial en la apoptosis. Un estudio realizado por Cost y colaboradores demostró que la eliminación de la expresión de ambos genes con ZFNs en células CHO les otorgó resistencia a la apoptosis, lo que aumentó la producción de proteínas recombinantes a escala industrial (Cost et al., 2010). Posteriormente, Zhang y colaboradores encontraron que la eliminación de la expresión de ciertas caspasas ejecutoras (aguas abajo en la ruta de BAX/BAK) con CRISPR-Cas9 en células HEK-293 también mejoró la producción de proteínas y el título viral (W. Zhang et al., 2017). Por lo tanto, parece tener sentido investigar si la eliminación de la expresión de BAX y BAK en las células empaquetadoras reduce la apoptosis mitocondrial y se correlaciona con un aumento en el título viral.

3.1. Generación de células HEK-293T BAX-KO

En primer lugar, realizamos un estudio para comprobar el efecto de la eliminación del gen BAX en las células empaquetadoras de VLs de referencia, HEK-293T. Aunque ciertos estudios sugieren que el incremento de la resistencia a la apoptosis mitocondrial depende de la eliminación de ambos genes (Cost et al., 2010), nos centramos, en primer lugar, en comprobar si la eliminación específica de BAX presentaba alguna mejora en el título viral.

Con esta finalidad se diseñaron dos ARNs guía dirigidos a los exones 3 (sgRNA 1) y 4 (sgRNA 2) del locus BAX (**Fig. 40A**). Los guías se entregaron en forma de ARN, y Cas9 se suministró como proteína recombinante, formando un complejo ribonucleoproteico que se introdujo mediante nucleofección. Utilizamos la plataforma ICE de Synthego para evaluar la eficacia de la eliminación del gen, obteniendo

un porcentaje de inserciones y deleciones (INDELS) de alrededor del 90% con ambos guías (**Fig. 40B**).

Para comprobar si la edición del gen BAX tenía algún efecto sobre el título viral, se produjeron VLs utilizando tres plásmidos de diferente tamaño y bioactividad: SEWP, que codifica para GFP y es un plásmido pequeño (5kb de LTR a LTR); LOPeGFP, un plásmido muy largo que también codifica para GFP (8kb de LTR a LTR); y CAR19, un plásmido mediano que codifica para un CAR α CD19 de tercera generación (6.3kb de LTR a LTR). Se determinó el título efectivo mediante la transducción de células Jurkat y se observó que la eliminación de BAX presentó cierta tendencia a aumentar el título viral de los VLs producidos con células BAX-KO, especialmente utilizando el sgRNA 2, aunque este efecto no se observó en LOPeGFP (**Fig. 40C**)

Parece haber consenso en que un incremento de la densidad celular genera un estrés metabólico en las células que detona la vía de muerte por apoptosis mitocondrial, mediada por BAX y BAK. Por tanto, quisimos corroborar si la producción de VLs con una mayor densidad derivaría en un mayor título viral usando las células BAX-KO. Para ello, produjimos VLs (con los plásmidos SEWP y LOPeGFP) con dos densidades celulares diferentes (80% como densidad estándar, y 95% como densidad elevada) comparando las células HEK-293T WT y BAX-KO. En el caso de SEWP, los resultados fueron en línea con la hipótesis, pues prácticamente no observamos diferencias con una densidad del 80%, pero las células BAX-KO mostraron un título viral mayor que las WT a una densidad límite (**Figura 40D, izquierda**). Por otra parte, con LOPeGFP se observó lo mismo con las células BAX-KO, aunque esta misma tendencia fue observada con las células WT (**Fig. 40D, derecha**).

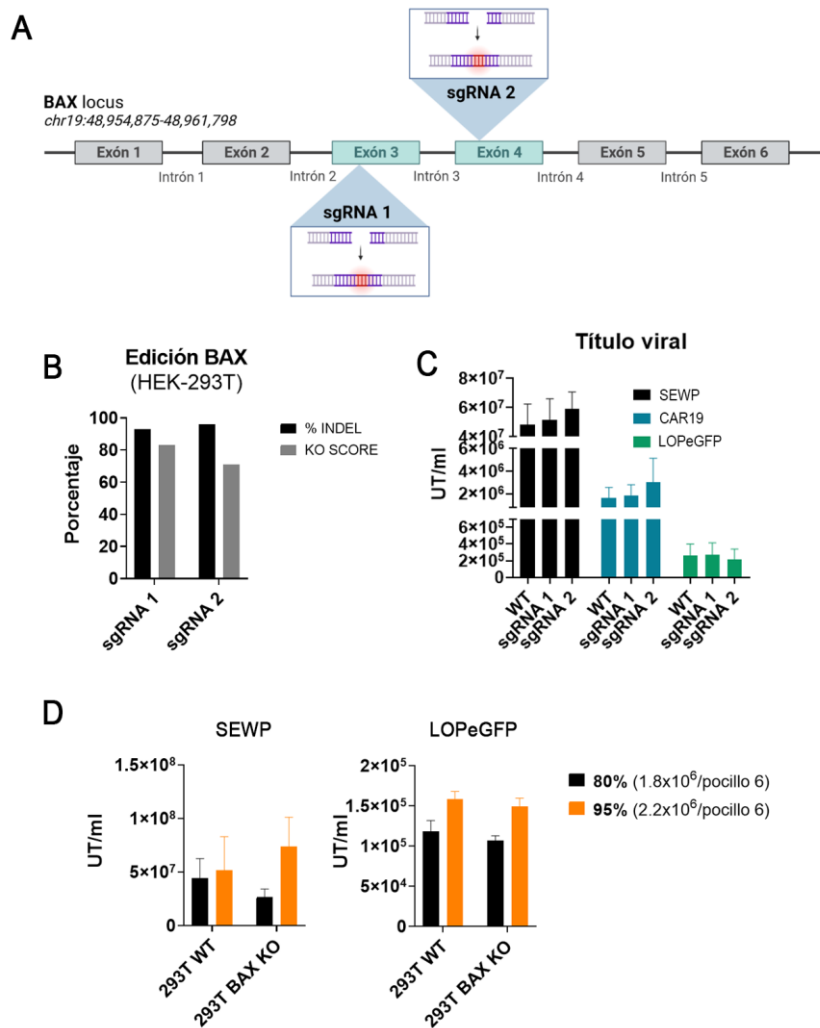


Figura 40. Generación de células HEK-293T BAX-KO y comparativa de producción viral.

A) Locus del gen BAX y regiones de reconocimiento de los ARNs guía. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de INDELs y el KO score de las células editadas con los sgRNAs 1 y 2. **C)** Gráfica que muestra el título funcional de los VLs producidos por las células HEK-293T WT, editadas con sgRNA 1 y 2, para SEWP (barras negras), CAR19 (barras azules) y LOPeGFP (barras verdes) (n=4). **D)** Título viral comparando diferentes densidades de células WT y editadas con sgRNA 2 con los plásmidos SEWP y LOPeGFP (n=4).

INDEL: inserciones-delecciones; sgRNA: *single guide RNA* (ARN guía simple); WT: *wild-type* (fenotipo silvestre); UT/ml: unidades transductoras/mililitro.

Estos resultados sugieren que existe una posibilidad de mejorar el título viral de algunos VLs utilizando las células BAX-KO. Sin embargo, es importante destacar que aún no se ha logrado significancia estadística.

3.2. Generación y uso de células HEK-293T BAX/BAK-KO (DKO)

Observada cierta tendencia de mejora en el título viral con la interrupción de BAX, decidimos interrumpir también BAK para generar células que fueran más resistentes a la apoptosis, y corroborar la mejora en el título viral. Para ello, diseñamos un ARN guía dirigido al exón 4 del locus BAK (**Fig. 41A**). Editamos siguiendo el procedimiento anterior tanto células HEK-293T WT como HEK-293T BAX-KO (editadas con sgRNA 2 para BAX), para corroborar que la eficiencia de edición era independiente de la modificación genética previa, y en ambos casos obtuvimos un porcentaje de INDELS cercano al 80% (**Fig. 41B**).

Una vez generadas las células DKO, produjimos VLs comparando las células WT con las DKO, con 3 VLs que expresan diferentes proteínas potencialmente tóxicas: LV-ABCB1, que codifica para una proteína de membrana miembro de los transportadores ABC; VL-CAREDA, que codifica para un CAR α EDA de segunda generación; y VL-CARCD19, que codifica para el CAR ARI-0001. En el caso de ambos CARs, observamos que las células DKO generaron un título viral significativamente superior a las células WT (**Fig. 41C, medio y derecha**), mientras que en el caso de ABCB1, pese a no haber significancia estadística, se observó la misma tendencia (**Fig. 41C, izquierda**). Además, observamos que las células empaquetadoras DKO, tras el estrés de la transfección, presentaron unos niveles de apoptosis significativamente menores que los de las células WT (así como una tendencia a una menor necrosis) (**Fig. 41D**), lo que podría explicar la mejora en el título viral.

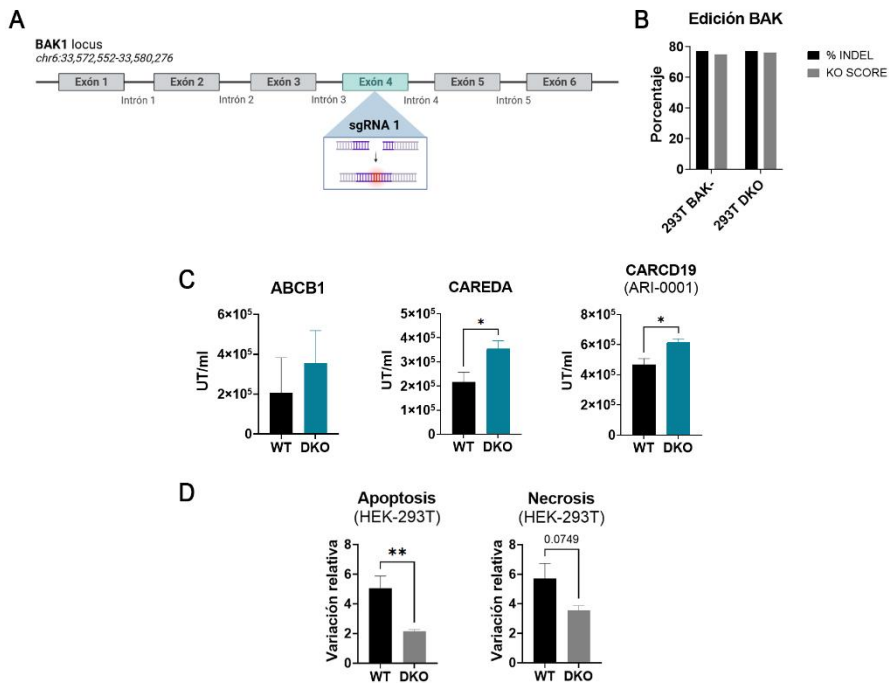


Figura 41. Generación de células HEK-293T BAX/BAK-KO, comparativa de producción viral y apoptosis.

A) Locus genómico correspondiente al gen BAK y región de reconocimiento del ARN guía. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de INDELs y el KO score de las células BAK- y DKO. **C)** Gráficas que representan los títulos obtenidos con células WT o DKO para VLs ABCB1 (izquierda), VLs CAREDA (centro) y VLs CARCD19 (izquierda) (ABCB1: n=4; CAREDA: n=13; CARCD19: n=3). **D)** Variación relativa de la apoptosis (izquierda) y de la necrosis (derecha) de células empaquetadoras WT y DKO 72 horas post-transfección de los 3 VLs (ABCB1, CAREDA, CARCD19) (n=5). La variación relativa de la apoptosis se ha calculado dividiendo el % de células 7AAD-AnexinaV+ tras la transfección entre el % de células 7AAD-AnexinaV+ a nivel basal. La variación relativa de la necrosis se ha calculado dividiendo el % de células 7AAD+ tras la transfección entre el % de células 7AAD+ a nivel basal. El análisis estadístico se basa en un T-test no pareado de dos colas, *p<0,05; **p<0,01.

INDEL: inserciones-deleciones; sgRNA: *single guide RNA* (ARN guía simple); WT: *wild-type* (fenotipo silvestre); UT/ml: unidades transductoras/mililitro.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La terapia CAR-T ha demostrado resultados sin precedentes en el tratamiento de neoplasias hematológicas de linaje B, logrando altas tasas de respuesta completa en pacientes que no tienen otras opciones terapéuticas. Actualmente, hay más de 1000 ensayos clínicos que utilizan células CAR-T, lo que ha llevado a la aprobación de 6 medicamentos de terapias avanzadas basados en CAR-T por la FDA y la EMA.

Aunque la terapia CAR-T ha demostrado una alta eficacia en el tratamiento de cánceres líquidos, su aplicación no está exenta de limitaciones y efectos secundarios. Parte de los pacientes tratados pueden experimentar recaídas debido a la presión ejercida por las células CAR-T contra el tumor o por una falta de persistencia de las células CAR-T, lo que limita su capacidad para eliminar el tumor. Además, ciertas toxicidades asociadas a una potencia descontrolada, como la neurotoxicidad, la citotoxicidad *on-target off tumor* o una tormenta de citoquinas no controlada, pueden causar efectos secundarios graves e incluso la muerte de pacientes.

Sin embargo, la aplicación de la terapia CAR-T a tumores sólidos ha generado una respuesta terapéutica mucho más reducida. Esto es debido a que las barreras a las que se enfrentan las células CAR-T son mucho mayores en un contexto de un tumor sólido que en el tratamiento de tumores líquidos: un tumor sólido contiene un entorno estructuralmente muy complejo, con una elevada heterogeneidad intratumoral, que dificulta la elección de un antígeno expresado exclusivamente (o mayoritariamente) en el tejido tumoral al que se pueda redirigir al CAR; la localización de los tumores sólidos, la presencia de un entorno fibrótico y la inhibición de moléculas de

extravasación y moléculas quimioatrayentes limita enormemente el tráfico y la infiltración hacia el tumor de las células T; finalmente, una limitación mayor es el fuerte microambiente tumoral, que ejerce una fuerte acción pro-tumoral e inmunosupresora, lo que deriva en un agotamiento prematuro de las pocas células CAR-T que puedan haberse infiltrado.

La falta de persistencia es una limitación crucial para la terapia CAR-T en cualquier tipo de tumor, ya sea líquido o sólido. Esta limitación se debe a factores intrínsecos al tipo de tumor, así como a factores inherentes al propio CAR, como la señalización tónica. Es importante abordar estos problemas para mejorar la eficacia y seguridad de la terapia CAR-T en el tratamiento de neoplasias malignas.

Finalmente, otra limitación importante está asociada al método de entrega de transgenes utilizado en la terapia CAR-T. Los vectores lentivirales se han establecido como el método estándar para la entrega de CARs y otros transgenes, como en el caso de los TRUCKs. Aunque son altamente eficaces y seguros, existen ciertos problemas relacionados con su manufactura. Por ejemplo, la entrega de genes altamente bioactivos (como el CAR o ciertas citoquinas) puede aumentar la muerte de las células que producen los VLs durante el proceso de producción, lo que puede resultar en títulos virales más bajos. Además, el tamaño del transgén es inversamente proporcional al título viral, por lo que vectores más grandes (como los utilizados en la generación de TRUCKs) pueden producir menor cantidad de VLs. Por último, la estandarización de la terapia CAR-T requiere la producción de grandes cantidades de VLs, lo que puede aumentar significativamente el coste de la terapia. Es decir, una optimización en el proceso de fabricación para obtener vectores lentivirales con títulos más altos puede mejorar la estandarización de la terapia y reducir su coste.

Con el objetivo de avanzar en el incremento de eficacia y seguridad de las células CAR-T, en esta tesis se han propuesto tres objetivos que discutiremos a continuación.

Desarrollo de nuevos promotores para una expresión fisiológica

En la **sección 8.1** del capítulo 8, se destaca la importancia de controlar la expresión y señalización del CAR para evitar el agotamiento prematuro de las células CAR-T, que puede ocurrir como resultado de una expresión excesiva y continua del CAR en la membrana celular. Varias investigaciones han subrayado la necesidad de reducir o controlar la señalización permanente del CAR, especialmente impuesta por promotores fuertes como EF1 α , que son considerados el *gold standard* para la expresión de CARs (Eyquem et al., 2017) (Weber et al., 2021). El grupo de investigación liderado por el Dr. Sadelain obtuvo resultados en esta línea, utilizando CRISPR-Cas9 y AAVs para introducir un CAR α CD19 en el locus TRAC. Los resultados mostraron que el CAR seguía la cinética de expresión del TCR endógeno después del encuentro con el antígeno, lo que resultó en células CAR-T con propiedades mejoradas, como un fenotipo menos diferenciado, menor agotamiento y menor señalización tónica, derivando en una mayor actividad antitumoral (Eyquem et al., 2017). Pese al avance en seguridad, el uso de CRISPR-Cas9 sigue presentando incógnitas en cuanto a su seguridad, debido a la posibilidad de cortes fuera de diana, traslocaciones cromosómicas o grandes deleciones (Bothmer et al., 2020) (Maldonado-Perez et al., 2022). Por lo tanto, una aproximación clínicamente más cercana podría ser el uso de promotores que imiten el patrón de expresión del TCR en el contexto de un VL.

En este sentido, nuestro grupo utilizó el promotor AW para aplicarlo al CAR ARI-0001, consiguiendo mejorar las propiedades del producto sin

comprometer la eficacia antitumoral (Tristán-Manzano et al., 2022). Pese a los buenos resultados obtenidos, la densidad de expresión del CAR fue baja, por lo que diseñamos dos promotores sintéticos con el objetivo de mimetizar el patrón de expresión del TCR, pero con mayores niveles de expresión, basándonos en los loci CD4 y B2M. El promotor B2M mantuvo el patrón de expresión TCR-like en células T CD4 y CD8, así como en células T_{naïve/SCM} y T_{CM}, algo que puede ser relevante, ya que los trabajos previos en esta dirección indican que el control de la expresión del CAR deriva en un fenotipo menos diferenciado (Eyquem et al., 2017) (Weber et al., 2021) (Tristán-Manzano et al., 2022). Además, dado que la infusión de células CAR-T en estadios más *stem* favorece una actividad antitumoral más duradera (Gattinoni et al., 2011), el mantenimiento del control de la expresión del CAR en poblaciones menos diferenciadas puede ser relevante para una terapia efectiva.

El promotor CD4, pese a no expresar GFP de manera similar al TCR, presenta una propiedad muy interesante, pues permite expresar transgenes de manera restringida a tejido, exclusivamente en aquellas células que expresan CD4 de manera natural. Esto puede ser útil en la mejora de la manufactura de células CAR-T o TRUCK, pues permitiría producir VLs sin que las células empaquetadoras expresen el transgén que, en caso de ser tóxico, puede reducir considerablemente el título viral (Han et al., 2021).

El análisis *in silico* reveló un posible papel de FOXP3 en la regulación de los promotores TCR-like. FOXP3 es un regulador crucial de la activación y proliferación de las células T. Después de la activación del TCR, la expresión de FOXP3 permite la respuesta inicial de las células Tconv pero luego limita su función (Bettelli et al., 2005) (McMurphy et al., 2013). Nuestra hipótesis es que FOXP3 podría tener una función similar en nuestros promotores sintéticos, conteniendo la expresión después

de la activación. Sin embargo, es importante destacar que este análisis *in silico* es meramente predictivo, y que todos estos resultados deben de ser validados experimentalmente.

En definitiva, los resultados sugieren que el promotor B2M puede ser un buen candidato para expresar CARs en células T con el objetivo de mejorar las propiedades del producto, mientras que el promotor CD4 puede ser útil para contribuir a la mejora de la manufactura de VLs. Sin embargo, son necesarios experimentos utilizando genes de interés (CARs, citoquinas...) para confirmar la eficacia de estos promotores.

Mejora de la actividad antitumoral de las células CAR-T19 controlando la expresión de IL-18

A lo largo del manuscrito se ha evidenciado que la terapia CAR-T aún presenta un amplio margen de mejora en su aplicación en pacientes con linfomas agresivos y, especialmente, tumores sólidos. Las células CAR-T convencionales no han demostrado ser lo suficientemente eficaces en estas situaciones, lo que suele resultar en recaídas frecuentes en el caso de las neoplasias líquidas y en una falta total de efecto terapéutico en el caso de los tumores sólidos.

Una de las alternativas más prometedoras y versátiles para mejorar la eficacia de la terapia CAR-T en neoplasias agresivas es el desarrollo de células CAR-T de 4ª generación (TRUCKs), células CAR-T reforzadas con moléculas inmunorreguladoras para superar las barreras propias del entorno hostil de los tumores. En ensayos clínicos, estos TRUCKs han demostrado resultados prometedores al sobreexpresar citoquinas, como IL-12, IL-15 e IL-18, que tienen una fuerte acción moduladora del sistema inmunitario y permiten una remodelación del TME. El TME es una de las principales causas de la disfuncionalidad prematura de las células CAR-T, tanto en linfomas como en tumores sólidos, por lo que

las estrategias para reducir su acción inmunosupresora están surgiendo como alternativas interesantes.

A pesar de que las células TRUCK que sobreexpresan citoquinas han demostrado un aumento en el efecto terapéutico en tumores de difícil tratamiento, su efecto inmunomodulador también puede provocar una elevada toxicidad si se producen de forma continua. La expresión sostenida de IL-12 e IL-15 se ha asociado con eventos severos de toxicidad, mientras que con IL-18 no se ha reportado una toxicidad grave, sin embargo, al ser precursor directo de IFN γ , no se puede descartar una posible toxicidad en pacientes. Por lo tanto, es fundamental controlar la expresión de estas citoquinas en las células CAR-T para lograr un equilibrio adecuado entre eficacia y seguridad.

El principal mecanismo propuesto para el control de estas citoquinas es el uso de promotores inducibles por activación, principalmente el promotor NFAT, que se ha aplicado para el control de IL-12 e IL-18. Pese a los buenos resultados obtenidos, se han reportado casos donde el promotor NFAT no ha sido capaz de controlar de manera adecuada la expresión de IL-12, derivando en una toxicidad letal *in vivo* (Alsaieedi et al., 2019). Esto se debe a que este promotor se activa en respuesta a la activación de la célula T, lo cual puede no ser dependiente exclusivamente del reconocimiento antigénico del CAR. Por ejemplo, situaciones de activación vía TCR, exposición a citoquinas, o una elevada señalización tónica del CAR puede detonar la activación del promotor y la liberación inespecífica e indeseada de la citoquina. Como alternativa, se han realizado aproximaciones usando sistemas Tet-On, de expresión inducible por doxiciclina, con resultados realmente prometedores (Alsaieedi et al., 2019). Los sistemas Tet-On presentan una capacidad diferencial con respecto al uso de promotores inducibles por activación, y es que son capaces de detonar la activación génica de

manera exógena, mediante doxiciclina, independientemente del estado de activación de la célula T. Sin embargo, los sistemas inducibles por tetraciclinas desarrollados actualmente utilizan proteínas transactivadoras, quimeras virales/bacterianas que presentan potenciales riesgos para la seguridad del paciente, lo que pueden frenar su aplicación clínica (**introducción, sección 8.3**).

Por consiguiente, empleamos el sistema Lent-On-Plus (LOP) para producir células CAR-T α CD19 que puedan expresar IL-18 de manera inducible por doxiciclina. Este sistema, al no requerir proteínas transactivadoras, permite una aproximación más cercana a la clínica (como se detalla en la **introducción, sección 8.3**). Hasta dónde llega nuestro conocimiento, y hasta el día de la escritura de esta tesis, mostramos las primeras células CAR-T que inducen de manera exógena la expresión de IL-18 (iTRUCK19.18).

La generación de las células iTRUCK19.18 mediante co-transducción con VL-ARI y LOP18 resulta en la generación de poblaciones heterogéneas (poblaciones doble positivas, doble negativas, CAR+IL18- y CAR-IL18+). Aunque lo ideal sería obtener poblaciones más homogéneas, en el caso de IL-18, su importancia se reduce, ya que las células CAR+IL18- tienen acción antitumoral *per se*, mientras que las células CAR-IL18+ ofrecen un soporte a todas las células T, porten o no el CAR, ya que todas las células T tienen receptores de IL-18, y su efecto *bystander* aumentará su acción antitumoral. Además, el uso de dos vectores independientes proporciona una mayor versatilidad al sistema, lo que permite su aplicación en combinación con cualquier CAR, TCR sintético o incluso sobre TILs, sin necesidad de modificar el esqueleto lentiviral.

Una vez generadas las células iTRUCK19.18, observamos secreción de IL-18 exclusivamente cuando activamos las células T (con niveles de secreción similares a los observamos con NFAT.IL18 (Glienke et al., 2022)), mientras que no observamos secreción en ausencia de activación. Esto no parece correlacionarse con los resultados de producción intracelular de pro-IL18, donde sí observamos un incremento de expresión en ausencia de activación, por lo que es posible que se produzca cierta secreción a nivel basal, pero que sea menor que el límite de detección de nuestro sistema. Pese a ser necesaria confirmación experimental de manera directa, esta hipótesis estaría apoyada por los datos obtenidos posteriormente, donde observamos cambios funcionales de las células iTRUCK19.18 exclusivamente en presencia de dox a nivel basal. El incremento de citoquinas pro-inflamatorias, marcadores de AICD y marcadores de activación nos pueden estar indicando la acción de IL-18 sobre las células iTRUCK19.18, así como especialmente la fuerte polarización de macrófagos observada, con una disminución drástica de macrófagos M2 y un incremento de M1 de manera dox-dependiente, resultados que van en línea con los obtenidos por otros grupos (Chmielewski & Abken, 2017). Por una parte, los resultados nos indican la bioactividad de la IL-18 producida, pues ésta genera efectos funcionales sobre las células T y los macrófagos; por otra parte, la capacidad de inducir IL-18 por dox nos permite controlar esta activación celular, por lo que nos permite controlar la potencia de las células iTRUCK19.18, pudiendo incrementar, potencialmente, la seguridad de la terapia.

Quisimos realizar la prueba de concepto del sistema LOP18 en modelos de tumores líquidos y sólidos agresivos, por lo que elegimos un modelo de linfoma de Burkitt (células Namalwa) y un modelo de adenocarcinoma pancreático (células MIA PaCa2 CD19+).

Realizamos estudios de citotoxicidad con re-estimulaciones tumorales continuas para recrear una situación de encuentro tumoral permanente, con el objetivo de mimetizar un ambiente hostil continuo, para maximizar las diferencias entre las condiciones experimentales. Los análisis en modelos de linfoma (Namalwa) mostraron que las células iTRUCK19.18 tienen una actividad antitumoral superior a las CAR-T19, y que esa actividad puede ser controlada con doxiciclina. Este incremento de la potencia parece ser, en parte, debido a la mejora del fenotipo de las células CAR-T en presencia de dox (a través del mantenimiento de poblaciones más *stem*), en línea con lo observado recientemente por Jaspers y colaboradores (Jaspers et al., 2023).

Para completar la validación del funcionamiento del sistema, enfrentamos a células iTRUCK19.18 con tumores primarios de pacientes con neoplasias B. Observamos que tanto enfrentando células iTRUCK19.18 generadas a partir de diferentes donantes sanos como generadas a partir de células T de paciente, al añadir dox y producir IL-18, se incrementó la eliminación tumoral. Se seleccionaron muestras de pacientes con neoplasias de elevada agresividad y con niveles heterogéneos de CD19: pacientes con linfoma de zona marginal leucemizado y con leucemia linfocítica crónica. Además, el hecho de generar células iTRUCK19.18 a partir de células de paciente nos permite confirmar que la generación de células iTRUCK mediante co-transducción es factible, alcanzando niveles de expresión suficientes de ambos transgenes.

Una vez confirmada la eficacia de nuestro sistema en modelos de neoplasias líquidas, evaluamos su actividad en un modelo de tumor sólido, para corroborar que la eficacia no es dependiente del modelo tumoral. Observamos, de nuevo, un incremento de la potencia antitumoral tanto *in vitro*, como *in vivo* en un modelo de tumor

pancreático que expresaba niveles heterogéneos de CD19. Al igual que en el modelo de linfoma, se observó un fenotipo menos diferenciado y menos agotado, que resultaba en una mayor eficacia antitumoral. Nuestra hipótesis es que es precisamente esta mejora del fenotipo y la retención del agotamiento celular la que permita un mayor *fitness* de las células T, que finalmente se traduce en una mayor potencia antitumoral.

Sin embargo, los estudios *in vivo* del modelo de tumor pancreático nos arrojaron resultados que no se correlacionan completamente con los obtenidos en el estudio del modelo murino de linfoma de Burkitt: en primer lugar, cuando analizamos el modelo de linfoma, observamos que los ratones tratados las células iTRUCK19.18 presentaron una mayor proporción de células T tanto en sangre, como en los órganos que se analizaron en el momento del sacrificio, mientras que en el modelo murino de tumor sólido, hemos encontrado una mayor proporción de células T infiltradas en el caso de los ratones tratados con células ARI. Una posible explicación puede deberse al momento del análisis de los órganos: en el modelo de linfoma, las células T se encontraban en una situación de enfrentamiento tumoral activo en el momento del sacrificio, algo que se puede intuir por: 1) la detección de células Namalwa en el momento del sacrificio y 2) por el incremento en los marcadores de agotamiento celular; de la misma manera, en el modelo de tumor sólido, es probable que los ratones tratados con células ARI se encontraran también en un momento de enfrentamiento tumoral activo en el sacrificio, pues observamos que la condición ARI presenta células tumorales vivas, además de una tendencia de las células ARI a presentar mayores niveles de LAG3 y TIM3. Por otra parte, es posible que las células iTRUCK19.18 hubieran eliminado el tumor más rápido, y llevaran una mayor cantidad de tiempo sin reconocer antígeno en comparación con las células ARI, algo que podría estar apoyado por los

ratones +dox, en los cuales no encontramos células tumorales vivas, por la tendencia a un fenotipo menos diferenciado y a un menor agotamiento de las células T, al menos en algunos órganos.

Sin embargo, es importante remarcar una limitación de los estudios *in vitro* e *in vivo* presentados en este objetivo. La expresión de IL-18 presenta dos papeles fundamentales: 1) un incremento de la actividad citotóxica de las propias células CAR-T que la liberan, y 2) un reclutamiento de células inmunitarias seguidas de una remodelación del TME, y es la conjunción de ambos factores lo que ha determinado el éxito de los TRUCKs-IL18 presentados por otros grupos a nivel preclínico y a nivel de ensayo clínico. Sin embargo, una limitación a la que nos enfrentamos fue la utilización de modelos *in vitro* sin componentes del TME, así como el uso de modelos murinos inmunodeprimidos, que carecen de poblaciones inmunitarias humanas. Por tanto, los resultados obtenidos muestran exclusivamente el efecto de la IL-18 en el incremento de la potencia citotóxica de las células CAR-T, mientras que estamos perdiendo los efectos propios de la modulación del entorno inmunitario, que pueden ser incluso mayores. Por tanto, una posible alternativa a explorar es el uso de modelos multicelulares 3D, que simulen la presencia del TME, así como el uso de modelos murinos humanizados, donde se puedan corroborar los efectos completos de la expresión de IL-18.

Generación de células empaquetadoras más eficientes para la producción de VLs

Las células HEK-293T son ampliamente reconocidas como el estándar para la producción de VLs tanto en la academia como en la industria. A pesar de la investigación extensa en este proceso, producir VLs que codifiquen proteínas altamente potentes, inductoras de apoptosis o

tóxicas sigue siendo un desafío. Para abordar este problema, nuestro estudio se centró en generar una línea celular empaquetadora más resistente a la apoptosis, con el objetivo de incrementar el título viral.

En la producción de VLs, la apoptosis es un proceso crítico, especialmente cuando el plásmido de transferencia codifica proteínas tóxicas. Esto puede provocar un aumento de la apoptosis celular en las células empaquetadoras, lo que limita la cantidad de VLs que se pueden producir. Este problema es particularmente relevante en la terapia CAR-T, ya que las células diana son resistentes a la modificación genética (Ghassemi et al., 2022), por lo que se requieren altos títulos virales para lograr niveles terapéuticos del transgén expresado. Si los títulos virales son insuficientes, se puede requerir un mayor proceso de concentración, lo que podría disminuir la calidad del producto o requerir múltiples rondas de producción, lo que aumentaría los costes y el tiempo de fabricación. Esto no siempre es aceptable para pacientes con neoplasias avanzadas con un tiempo crítico (Cribbs et al., 2013) (Blache et al., 2022). Por lo tanto, es importante encontrar formas de mejorar la producción de VLs en células empaquetadoras más resistentes a la apoptosis.

Para aumentar la producción de proteínas recombinantes y reducir la apoptosis celular, algunos investigadores han utilizado herramientas de edición genómica para eliminar la expresión de ciertos genes. Cost y colaboradores (Cost et al., 2010) utilizaron ZFNs para eliminar los genes BAX y BAK en células CHO, lo que las hizo más resistentes a la apoptosis, incrementando la producción de proteínas recombinantes. En otro estudio más reciente, Zhang y colaboradores (W. Zhang et al., 2017) eliminaron caspasas ejecutoras de apoptosis (Caspasa 3, 6 y 7) y AIF1 en células HEK-293T. Aunque esperaban que esta eliminación

redujera completamente la apoptosis, no consiguieron reducir la apoptosis dependiente de BAX ni la vía de la necroptosis.

Con el fin de mejorar los títulos virales, nuestro estudio se centró en generar células HEK-293T resistentes a la apoptosis intrínseca (la mayoritaria que sufren las células empaquetadoras al producir VLs) mediante la interrupción de los genes BAX y BAK usando de CRISPR-Cas9. En primer lugar, generamos células HEK-293T BAX-KO para evaluar el efecto de la eliminación de este gen en el título viral, pero no se observó una mejora significativa. Esto concuerda con otros estudios que sugieren que la eliminación de ambas proteínas, BAX y BAK, es necesaria para reducir la apoptosis mitocondrial (Cost et al., 2010). Posteriormente, generamos células HEK-293T BAX/BAK-KO (DKO) y ahora sí observamos un aumento significativo en los títulos virales de dos VLs-CAR diferentes, junto con una reducción en la apoptosis asociada, lo que podría explicar la mejora en los títulos obtenidos.

En base a los datos obtenidos, y teniendo en cuenta el mecanismo utilizado, existe aún rango de mejora en la generación de células empaquetadoras que produzcan mayores títulos virales. Por una parte, todos los estudios se han realizado utilizando una población *bulk*, y pese a que los porcentajes de edición son elevados, el hecho de trabajar con una población mixta puede estar atenuando los resultados observados. El uso de poblaciones clonales puede permitir un estudio con una mayor diferencia en la apoptosis y títulos virales basados en unos resultados más homogéneos. Por otra parte, la disrupción de BAX y BAK no elimina completamente la muerte celular por apoptosis. BAX y BAK permiten la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y la liberación del citocromo C, derivando en un estado de apoptosis (Pena-Blanco & Garcia-Saez, 2018). Esta vía se conoce como apoptosis intrínseca, que coexiste con la apoptosis extrínseca,

detonada por receptores de muerte celular, así como con la necroptosis, derivada de la interacción de la interacción de TNF con su receptor.

En resumen, las células HEK-293T BAX/BAK-KO presentadas aquí pueden constituir una alternativa prometedora para la generación de VLs que codifican CARs. Además, pese a necesitar una optimización adicional, este estudio proporciona un avance en la generación de células empaquetadoras más resistentes a la apoptosis para producir VLs o proteínas recombinantes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El promotor sintético B2M es un buen candidato para la generación de células CAR-T que requieran una expresión alta y fisiológica del CAR.
2. El sistema Lent-On-Plus permite generar células T primarias que secreten IL-18 solo en presencia de doxíciclina, tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. Usando el sistema Lent-On-Plus, se han generado las primeras TRUCKs inducibles sin transactivadores y capaces de ser controladas por la administración de doxíciclina (iTRUCK19.18).
4. La expresión inducible de IL-18 permite la polarización de macrófagos humanos y el control del grado de activación de las células CAR-T sin incrementar el agotamiento celular.
5. La administración de doxíciclina a las iTRUCK19.18 aumenta su actividad antitumoral frente a modelos linfoma de Burkitt y adenocarcinoma pancreático, tanto *in vitro* como *in vivo*.
6. La administración de doxíciclina a las iTRUCK19.18 aumenta su actividad antitumoral frente a tumores primarios de linaje B.
7. Las células HEK-293T BAX/BAK-KO incrementan el título viral de vectores que codifican para dos CARs diferentes.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abou-El-Enin, M., Elsallab, M., Feldman, S. A., Fesnak, A. D., Heslop, H. E., Marks, P., Till, B. G., Bauer, G., & Savoldo, B. (2021). Scalable Manufacturing of CAR T cells for Cancer Immunotherapy. *Blood Cancer Discov*, 2(5), 408-422. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-21-0084>
- Abramson, J. S., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D. G., Andreadis, C., Sehgal, A., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Garcia, J., Kostic, A., Mallaney, M., Ogasawara, K., Newhall, K., . . . Siddiqi, T. (2020). Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*, 396(10254), 839-852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0)
- Adachi, K., Kano, Y., Nagai, T., Okuyama, N., Sakoda, Y., & Tamada, K. (2018). IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol*, 36(4), 346-351. <https://doi.org/10.1038/nbt.4086>
- Afify, S. M., & Seno, M. (2019). Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers*, 11(3), 345. <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/3/345>
- Agarwalla, P., Ogunnaike, E. A., Ahn, S., Froehlich, K. A., Jansson, A., Ligler, F. S., Dotti, G., & Brudno, Y. (2022). Bioinstructive implantable scaffolds for rapid in vivo manufacture and release of CAR-T cells. *Nat Biotechnol*, 40(8), 1250-1258. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01245-x>
- Akbar, A. N., & Henson, S. M. (2011). Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nature Reviews Immunology*, 11(4), 289-295. <https://doi.org/10.1038/nri2959>
- Akkin, S., Varan, G., & Bilensoy, E. (2021). A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers. *Molecules*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/molecules26113382>
- Alabanza, L., Pegues, M., Geldres, C., Shi, V., Wiltzius, J. J. W., Sievers, S. A., Yang, S., & Kochenderfer, J. N. (2017). Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Mol Ther*, 25(11), 2452-2465. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.013>
- Alsaieedi, A., Holler, A., Velica, P., Bendle, G., & Stauss, H. J. (2019). Safety and efficacy of Tet-regulated IL-12 expression in cancer-specific T cells. *Oncoimmunology*, 8(3), 1542917. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1542917>
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619-634. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>
- Anurathapan, U., Chan, R. C., Hindi, H. F., Mucharla, R., Bajgain, P., Hayes, B. C., Fisher, W. E., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Brenner, M. K., Leen, A. M., & Vera, J. F.

- (2014). Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells. *Mol Ther*, 22(3), 623-633. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.262>
- Araki, K., Youngblood, B., & Ahmed, R. (2013). Programmed cell death 1-directed immunotherapy for enhancing T-cell function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 78, 239-247. <https://doi.org/10.1101/sqb.2013.78.019869>
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F. (2017). Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 390(10091), 298-310. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32407-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32407-2)
- Arnaudo, L. (2022). On CAR-Ts, decentralized in-house models, and the hospital exception. Routes for sustainable access to innovative therapies. *J Law Biosci*, 9(2), Isac027. <https://doi.org/10.1093/jlb/Isac027>
- Asmamaw Dejenie, T., Tiruneh, G. M. M., Dessie Terefe, G., Tadele Admasu, F., Wale Tesega, W., & Chekol Abebe, E. (2022). Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy. *Hum Vaccin Immunother*, 18(6), 2114254. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2114254>
- Ataca Atilla, P., McKenna, M. K., Tashiro, H., Srinivasan, M., Mo, F., Watanabe, N., Simons, B. W., McLean Stevens, A., Redell, M. S., Heslop, H. E., Mamonkin, M., Brenner, M. K., & Atilla, E. (2020). Modulating TNFalpha activity allows transgenic IL15-Expressing CLL-1 CAR T cells to safely eliminate acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer*, 8(2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001229>
- Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M., & Rosenberg, S. A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am*, 6 Suppl 1, S11-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685652>
- Avanzi, M. P., Yeku, O., Li, X., Wijewarnasuriya, D. P., van Leeuwen, D. G., Cheung, K., Park, H., Purdon, T. J., Daniyan, A. F., Spitzer, M. H., & Brentjens, R. J. (2018). Engineered Tumor-Targeted T Cells Mediate Enhanced Anti-Tumor Efficacy Both Directly and through Activation of the Endogenous Immune System. *Cell Rep*, 23(7), 2130-2141. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.051>
- Bagheri, S., Safaie Qamsari, E., Yousefi, M., Riazi-Rad, F., & Sharifzadeh, Z. (2020). Targeting the 4-1BB costimulatory molecule through single chain antibodies promotes the human T-cell response. *Cell Mol Biol Lett*, 25, 28. <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00219-8>
- Bajgain, P., Tawinwung, S., D'Elia, L., Sukumaran, S., Watanabe, N., Hoyos, V., Lulla, P., Brenner, M. K., Leen, A. M., & Vera, J. F. (2018). CAR T cell therapy for breast cancer: harnessing the tumor milieu to drive T cell activation. *J Immunother Cancer*, 6(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0347-5>
- Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, 588(2), 253-260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>
- Barros, L. R. C., Couto, S. C. F., da Silva Santurio, D., Paixao, E. A., Cardoso, F., da Silva, V. J., Klinger, P., Ribeiro, P., Ros, F. A., Oliveira, T. G. M., Rego, E. M., Ramos, R.

- N., & Rocha, V. (2022). Systematic Review of Available CAR-T Cell Trials around the World. *Cancers (Basel)*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/cancers14112667>
- Batra, S. A., Rathi, P., Guo, L., Courtney, A. N., Fleurence, J., Balzeau, J., Shaik, R. S., Nguyen, T. P., Wu, M. F., Bulsara, S., Mamonkin, M., Metelitsa, L. S., & Heczey, A. (2020). Glypican-3-Specific CAR T Cells Coexpressing IL15 and IL21 Have Superior Expansion and Antitumor Activity against Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Immunol Res*, 8(3), 309-320. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-19-0293>
- Behranvand, N., Nasri, F., Zolfaghari Emameh, R., Khani, P., Hosseini, A., Garssen, J., & Falak, R. (2022). Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 71(3), 507-526. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03013-3>
- Bell, M., & Gottschalk, S. (2021). Engineered Cytokine Signaling to Improve CAR T Cell Effector Function. *Front Immunol*, 12, 684642. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.684642>
- Benabdellah, K., Cobo, M., Munoz, P., Toscano, M. G., & Martin, F. (2011). Development of an all-in-one lentiviral vector system based on the original TetR for the easy generation of Tet-ON cell lines. *PLoS One*, 6(8), e23734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023734>
- Benabdellah, K., Gutierrez-Guerrero, A., Cobo, M., Munoz, P., & Martin, F. (2014). A chimeric HS4-SAR insulator (IS2) that prevents silencing and enhances expression of lentiviral vectors in pluripotent stem cells. *PLoS One*, 9(1), e84268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084268>
- Benabdellah, K., Muñoz, P., Cobo, M., Gutierrez-Guerrero, A., Sánchez-Hernández, S., Garcia-Perez, A., Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A. B., Toscano, M. G., & Martin, F. (2016). Lent-On-Plus Lentiviral vectors for conditional expression in human stem cells. *Scientific Reports*, 6(1), 37289. <https://doi.org/10.1038/srep37289>
- Berdeja, J. G., Madduri, D., Usmani, S. Z., Jakubowiak, A., Agha, M., Cohen, A. D., Stewart, A. K., Hari, P., Htut, M., Lesokhin, A., Deol, A., Munshi, N. C., O'Donnell, E., Avigan, D., Singh, I., Zudaire, E., Yeh, T. M., Allred, A. J., Olyslager, Y., . . . Jagannath, S. (2021). Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet*, 398(10297), 314-324. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00933-8)
- Bettelli, E., Dastrange, M., & Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14), 5138-5143. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501675102>
- Blache, U., Popp, G., Dunkel, A., Koehl, U., & Fricke, S. (2022). Potential solutions for manufacture of CAR T cells in cancer immunotherapy. *Nat Commun*, 13(1), 5225. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32866-0>
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., & Anderson,

- W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235), 475-480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, 3(1), 87-98. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90161-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90161-2)
- Bonifant, C. L., Jackson, H. J., Brentjens, R. J., & Curran, K. J. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*, 3, 16011. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.11>
- Boom, R., Sol, C. J., Minnaar, R. P., Geelen, J. L., Raap, A. K., & van der Noorda, J. (1988). Induction of gene expression under human cytomegalovirus immediate early enhancer-promoter control by inhibition of protein synthesis is cell cycle-dependent. *J Gen Virol*, 69 (Pt 6), 1179-1193. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-6-1179>
- Boomer, J. S., & Green, J. M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(8), a002436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>
- Borroni, E. M., & Grizzi, F. (2021). Cancer Immunoediting and beyond in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13275. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/24/13275>
- Bothmer, A., Gareau, K. W., Abdulkerim, H. S., Buquicchio, F., Cohen, L., Viswanathan, R., Zuris, J. A., Marco, E., Fernandez, C. A., Myer, V. E., & Cotta-Ramusino, C. (2020). Detection and Modulation of DNA Translocations During Multi-Genome Editing in T Cells. *CRISPR J*, 3(3), 177-187. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0074>
- Bożyk, A., Wojas-Krawczyk, K., Krawczyk, P., & Milanowski, J. (2022). Tumor Microenvironment—A Short Review of Cellular and Interaction Diversity. *Biology*, 11(6), 929. <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/6/929>
- Braendstrup, P., Levine, B. L., & Ruella, M. (2020). The long road to the first FDA-approved gene therapy: chimeric antigen receptor T cells targeting CD19. *Cytotherapy*, 22(2), 57-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcvt.2019.12.004>
- Brown, C. E., Alizadeh, D., Starr, R., Weng, L., Wagner, J. R., Naranjo, A., Ostberg, J. R., Blanchard, M. S., Kilpatrick, J., Simpson, J., Kurien, A., Priceman, S. J., Wang, X., Harshbarger, T. L., D'Apuzzo, M., Ressler, J. A., Jensen, M. C., Barish, M. E., Chen, M., . . . Badie, B. (2016). Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*, 375(26), 2561-2569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1610497>
- Bueno, C., Velasco-Hernandez, T., Gutierrez-Aguera, F., Zanetti, S. R., Baroni, M. L., Sanchez-Martinez, D., Molina, O., Closa, A., Agraz-Doblas, A., Marin, P., Eyras, E., Varela, I., & Menendez, P. (2019). CD133-directed CAR T-cells for MLL leukemia: on-target, off-tumor myeloablative toxicity. *Leukemia*, 33(8), 2090-2125. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0418-8>

- Bughda, R., Dimou, P., D'Souza, R. R., & Klampatsa, A. (2021). Fibroblast Activation Protein (FAP)-Targeted CAR-T Cells: Launching an Attack on Tumor Stroma. *Immunotargets Ther*, 10, 313-323. <https://doi.org/10.2147/ITT.S291767>
- Calderon, H., Mamonkin, M., & Guedan, S. (2020). Analysis of CAR-Mediated Tonic Signaling. *Methods Mol Biol*, 2086, 223-236. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0146-4_17
- Cannons, J. L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M. A., Yagita, H., Okumura, K., & Watts, T. H. (2001). 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol*, 167(3), 1313-1324. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1313>
- Cao, J., Wang, G., Cheng, H., Wei, C., Qi, K., Sang, W., Zhenyu, L., Shi, M., Li, H., Qiao, J., Pan, B., Zhao, J., Wu, Q., Zeng, L., Niu, M., Jing, G., Zheng, J., & Xu, K. (2018). Potent anti-leukemia activities of humanized CD19-targeted Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*, 93(7), 851-858. <https://doi.org/10.1002/ajh.25108>
- Capp, J.-P. (2019). Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *Journal of Oncology*, 2019, 5189232. <https://doi.org/10.1155/2019/5189232>
- Cappell, K. M., & Kochenderfer, J. N. (2021). A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol*, 18(11), 715-727. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00530-z>
- Caruana, I., Savoldo, B., Hoyos, V., Weber, G., Liu, H., Kim, E. S., Ittmann, M. M., Marchetti, D., & Dotti, G. (2015). Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes. *Nat Med*, 21(5), 524-529. <https://doi.org/10.1038/nm.3833>
- Castella, M., Boronat, A., Martin-Ibanez, R., Rodriguez, V., Sune, G., Caballero, M., Marzal, B., Perez-Amill, L., Martin-Antonio, B., Castano, J., Bueno, C., Balague, O., Gonzalez-Navarro, E. A., Serra-Pages, C., Engel, P., Vilella, R., Benitez-Ribas, D., Ortiz-Maldonado, V., Cid, J., . . . Juan, M. (2019). Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 12, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.11.010>
- Castella, M., Caballero-Banos, M., Ortiz-Maldonado, V., Gonzalez-Navarro, E. A., Sune, G., Antonana-Vidosola, A., Boronat, A., Marzal, B., Millan, L., Martin-Antonio, B., Cid, J., Lozano, M., Garcia, E., Tabera, J., Trias, E., Perpina, U., Canals, J. M., Baumann, T., Benitez-Ribas, D., . . . Juan, M. (2020). Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol*, 11, 482. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00482>
- Cesana, D., Santoni de Sio, F. R., Rudilosso, L., Gallina, P., Calabria, A., Beretta, S., Merelli, I., Bruzzesi, E., Passerini, L., Nozza, S., Vicenzi, E., Poli, G., Gregori, S., Tambussi, G., & Montini, E. (2017). HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells. *Nat Commun*, 8(1), 498. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00609-1>

- Chai, M. G., Kim-Fuchs, C., Angst, E., & Sloan, E. K. (2013). Bioluminescent orthotopic model of pancreatic cancer progression. *J Vis Exp*(76). <https://doi.org/10.3791/50395>
- Chang, C.-H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, Michael D., Noguchi, T., Curtis, Jonathan D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, Matthew M., van der Windt, Gerritje J. W., Tonc, E., Schreiber, Robert D., Pearce, Edward J., & Pearce, Erika L. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*, 162(6), 1229-1241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>
- Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J. M., Chen, T.-h. T., Maurer, M., Korman, A. J., & Zarour, H. M. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 2046-2058. <https://doi.org/10.1172/JCI80445>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4), 227-242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(10), 1357-1369. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>
- Chen, Y., Sun, C., Landoni, E., Metelitsa, L., Dotti, G., & Savoldo, B. (2019). Eradication of Neuroblastoma by T Cells Redirected with an Optimized GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and Interleukin-15. *Clin Cancer Res*, 25(9), 2915-2924. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1811>
- Chmielewski, M., & Abken, H. (2015). TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 15(8), 1145-1154. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1046430>
- Chmielewski, M., & Abken, H. (2017). CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep*, 21(11), 3205-3219. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.063>
- Clay, T. M., Custer, M. C., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S. A., & Nishimura, M. I. (1999). Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol*, 163(1), 507-513. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384155>
- Colamartino, A., Bifsha, P., Colas, C., Tremblay-Laganière, C., Nicoletti, S., Guiot, M., Boldici, A., Li, Y., & Haddad, E. (2019). A New Specific Promoter Allow Hematopoietic Stem Cell Immunotherapy Approach Against Acute Lymphoblastic Leukemia Using Chimeric Antigen Receptor. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25(3), S164. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.464>
- Conlon, K. C., Potter, E. L., Pittaluga, S., Lee, C. R., Miljkovic, M. D., Fleisher, T. A., Dubois, S., Bryant, B. R., Petrus, M., Perera, L. P., Hsu, J., Figg, W. D., Peer, C. J., Shih, J. H., Yovandich, J. L., Creekmore, S. P., Roederer, M., & Waldmann, T. A. (2019). IL15 by Continuous Intravenous Infusion to Adult Patients with Solid Tumors

- in a Phase I Trial Induced Dramatic NK-Cell Subset Expansion. *Clin Cancer Res*, 25(16), 4945-4954. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3468>
- Cost, G. J., Freyvert, Y., Vafiadis, A., Santiago, Y., Miller, J. C., Rebar, E., Collingwood, T. N., Snowden, A., & Gregory, P. D. (2010). BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 105(2), 330-340. <https://doi.org/10.1002/bit.22541>
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*, 342(6165), 1432-1433. <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>
- Cowan, A. J., Green, D. J., Kwok, M., Lee, S., Coffey, D. G., Holmberg, L. A., Tuazon, S., Gopal, A. K., & Libby, E. N. (2022). Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA*, 327(5), 464-477. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.0003>
- Cribbs, A. P., Kennedy, A., Gregory, B., & Brennan, F. M. (2013). Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC Biotechnology*, 13(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-98>
- Dai, H., Tong, C., Shi, D., Chen, M., Guo, Y., Chen, D., Han, X., Wang, H., Wang, Y., & Shen, P. (2020). Efficacy and biomarker analysis of CD133-directed CAR T cells in advanced hepatocellular carcinoma: a single-arm, open-label, phase II trial. *Oncoimmunology*, 9(1), 1846926. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1846926>
- Daniel, S. K., Sullivan, K. M., Labadie, K. P., & Pillarisetty, V. G. (2019). Hypoxia as a barrier to immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Transl Med*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0226-9>
- Davila, M. L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S. S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Fink, M., Shinglot, H., Youssif, M., Satter, M., Wang, Y., Hoseney, J., . . . Brentjens, R. (2014). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 6(224), 224ra225. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008226>
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25(10), 1010-1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Di Stasi, A., Tey, S. K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. A., Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M., & Brenner, M. K. (2011). Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 365(18), 1673-1683. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106152>
- Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., Johnson, R. S., & Goldrath, A. W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8+ T cells to persistent antigen. *Nature Immunology*, 14(11), 1173-1182. <https://doi.org/10.1038/ni.2714>

- Donda, A., Schulz, M., Burki, K., De Libero, G., & Uematsu, Y. (1996). Identification and characterization of a human CD4 silencer. *Eur J Immunol*, 26(2), 493-500. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260232>
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5(12), 1365-1369. <https://doi.org/10.1038/70932>
- Dougan, S. K. (2017). The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J*, 23(6), 321-325. <https://doi.org/10.1097/ppo.0000000000000288>
- Dreier, T., Lorenczewski, G., Brandl, C., Hoffmann, P., Syring, U., Hanakam, F., Kufer, P., Riethmuller, G., Bargou, R., & Baeuerle, P. A. (2002). Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *International Journal of Cancer*, 100(6), 690-697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.10557>
- Dufresne, A., Brahmi, M., Karanian, M., & Blay, J.-Y. (2018). Using biology to guide the treatment of sarcomas and aggressive connective-tissue tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(7), 443-458. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0012-4>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Ene-Obong, A., Clear, A. J., Watt, J., Wang, J., Fatah, R., Riches, J. C., Marshall, J. F., Chin-Aleong, J., Chelala, C., Gribben, J. G., Ramsay, A. G., & Kocher, H. M. (2013). Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 145(5), 1121-1132. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.025>
- Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S. J., Hamieh, M., Cunanan, K. M., Odak, A., Gonen, M., & Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 543(7643), 113-117. <https://doi.org/10.1038/nature21405>
- Farber, D. L., Yudanin, N. A., & Restifo, N. P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 24-35. <https://doi.org/10.1038/nri3567>
- Feucht, J., Sun, J., Eyquem, J., Ho, Y. J., Zhao, Z., Leibold, J., Dobrin, A., Cabriolu, A., Hamieh, M., & Sadelain, M. (2019). Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nat Med*, 25(1), 82-88. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0290-5>
- Finney, H. M., Lawson, A. D., Bebbington, C. R., & Weir, A. N. (1998). Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*, 161(6), 2791-2797. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743337>
- Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., Kirkwood, J. M., Kuchroo, V., & Zarour, H. M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1

expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2175-2186. <https://doi.org/10.1084/jem.20100637>

- Fraietta, J. A., Lacey, S. F., Orlando, E. J., Pruteanu-Malinici, I., Gohil, M., Lundh, S., Boesteanu, A. C., Wang, Y., O'Connor, R. S., Hwang, W. T., Pequignot, E., Ambrose, D. E., Zhang, C., Wilcox, N., Bedoya, F., Dorfmeier, C., Chen, F., Tian, L., Parakandi, H., . . . Melenhorst, J. J. (2018). Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*, 24(5), 563-571. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0010-1>
- Fraietta, J. A., Nobles, C. L., Sammons, M. A., Lundh, S., Carty, S. A., Reich, T. J., Cogdill, A. P., Morrisette, J. J. D., DeNizio, J. E., Reddy, S., Hwang, Y., Gohil, M., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Gupta, M., Chen, F., Everett, J. K., Alexander, K. A., Lin-Shiao, E., . . . Melenhorst, J. J. (2018). Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*, 558(7709), 307-312. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0178-z>
- Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R., & Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*, 251(4991), 313-316. <https://doi.org/10.1126/science.1846244>
- Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., Elstrom, R. L., June, C. H., & Thompson, C. B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, 16(6), 769-777. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00323-0)
- Frecha, C., Toscano, M. G., Costa, C., Saez-Lara, M. J., Cosset, F. L., Verhoeyen, E., & Martin, F. (2008). Improved lentiviral vectors for Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy mimic endogenous expression profiles throughout haematopoiesis. *Gene Ther*, 15(12), 930-941. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.20>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7), 1027-1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Fujiwara, K., Tsunei, A., Kusabuka, H., Ogaki, E., Tachibana, M., & Okada, N. (2020). Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051182>
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196(2), 261-282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., Palmer, D. C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S. E., Theoret, M. R., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1616-1626. <https://doi.org/10.1172/JCI24480>

- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M., & Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, 17(10), 1290-1297. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Gattinoni, L., Speiser, D. E., Lichterfeld, M., & Bonini, C. (2017). T memory stem cells in health and disease. *Nature Medicine*, 23(1), 18-27. <https://doi.org/10.1038/nm.4241>
- Gattinoni, L., Zhong, X.-S., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L. M., Paulos, C. M., Muranski, P., & Restifo, N. P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nature Medicine*, 15(7), 808-813. <https://doi.org/10.1038/nm.1982>
- Gerard, C. L., Delyon, J., Wicky, A., Homicsko, K., Cuendet, M. A., & Michielin, O. (2021). Turning tumors from cold to inflamed to improve immunotherapy response. *Cancer Treat Rev*, 101, 102227. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102227>
- Ghassemi, S., Durgin, J. S., Nunez-Cruz, S., Patel, J., Leferovich, J., Pinzone, M., Shen, F., Cummins, K. D., Plesa, G., Cantu, V. A., Reddy, S., Bushman, F. D., Gill, S. I., O'Doherty, U., O'Connor, R. S., & Milone, M. C. (2022). Rapid manufacturing of non-activated potent CAR T cells. *Nat Biomed Eng*, 6(2), 118-128. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00842-6>
- Ghosh, S., Brown, A., Jenkins, C., & Campbell, K. (2020). Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Applied Biosafety*, 25(1), 7-18. <https://doi.org/10.1177/1535676019899502>
- Glienke, W., Dragon, A. C., Zimmermann, K., Martyniszyn-Eiben, A., Mertens, M., Abken, H., Rossig, C., Altwater, B., Aleksandrova, K., Arseniev, L., Kloth, C., Stamopoulou, A., Moritz, T., Lode, H. N., Siebert, N., Blasczyk, R., Goudeva, L., Schambach, A., Kohl, U., . . . Esser, R. (2022). GMP-Compliant Manufacturing of TRUCKs: CAR T Cells targeting GD(2) and Releasing Inducible IL-18. *Front Immunol*, 13, 839783. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.839783>
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., & Pluckthun, A. (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, 29(6), 1362-1367. <https://doi.org/10.1021/bi00458a002>
- Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K., & Mamonkin, M. (2017). Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Rep*, 21(1), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.015>
- Gorabi, A. M., Hajighasemi, S., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2020). Cell transfer-based immunotherapies in cancer: A review. *IUBMB Life*, 72(4), 790-800. <https://doi.org/10.1002/iub.2180>

- Gorovits, B., & Koren, E. (2019). Immunogenicity of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapeutics. *BioDrugs*, 33(3), 275-284. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00354-5>
- Gradiz, R., Silva, H. C., Carvalho, L., Botelho, M. F., & Mota-Pinto, A. (2016). MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Sci Rep*, 6, 21648. <https://doi.org/10.1038/srep21648>
- Gropper, Y., Feferman, T., Shalit, T., Salame, T.-M., Porat, Z., & Shakhar, G. (2017). Culturing CTLs under Hypoxic Conditions Enhances Their Cytolysis and Improves Their Anti-tumor Function. *Cell Reports*, 20(11), 2547-2555. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.071>
- Gruss, H. J., Boiani, N., Williams, D. E., Armitage, R. J., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. (1994). Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood*, 83(8), 2045-2056. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161776>
- Gu, T., Zhu, M., Huang, H., & Hu, Y. (2022). Relapse after CAR-T cell therapy in B-cell malignancies: challenges and future approaches. *J Zhejiang Univ Sci B*, 23(10), 793-811. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2200256>
- Guedan, S., Madar, A., Casado-Medrano, V., Shaw, C., Wing, A., Liu, F., Young, R. M., June, C. H., & Posey, A. D., Jr. (2020). Single residue in CD28-costimulated CAR-T cells limits long-term persistence and antitumor durability. *J Clin Invest*, 130(6), 3087-3097. <https://doi.org/10.1172/JCI133215>
- Guedan, S., Posey, A. D., Jr., Shaw, C., Wing, A., Da, T., Patel, P. R., McGettigan, S. E., Casado-Medrano, V., Kawalekar, O. U., Uribe-Herranz, M., Song, D., Melenhorst, J. J., Lacey, S. F., Scholler, J., Keith, B., Young, R. M., & June, C. H. (2018). Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight*, 3(1). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96976>
- Guest, R. D., Hawkins, R. E., Kirillova, N., Cheadle, E. J., Arnold, J., O'Neill, A., Irlam, J., Chester, K. A., Kemshead, J. T., Shaw, D. M., Embleton, M. J., Stern, P. L., & Gilham, D. E. (2005). The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother*, 28(3), 203-211. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000161397.96582.59>
- Haist, C., Schulte, E., Bartels, N., Bister, A., Poschinski, Z., Ibach, T. C., Geipel, K., Wiek, C., Wagenmann, M., Monzel, C., Scheckenbach, K., & Hanenberg, H. (2021). CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol*, 116, 105259. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105259>
- Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, 96(12), 1679-1705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajh.26367>
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J.

- (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131(25), 2745-2760. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>
- Hamid, Q., Ito, I., & Muro, S. (2006). INTERLEUKINS | IL-15. In G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Eds.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 385-390). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00484-1>
- Hamieh, M., Dobrin, A., Cabriolu, A., van der Stegen, S. J. C., Giavridis, T., Mansilla-Soto, J., Eyquem, J., Zhao, Z., Whitlock, B. M., Miele, M. M., Li, Z., Cunanan, K. M., Huse, M., Hendrickson, R. C., Wang, X., Riviere, I., & Sadelain, M. (2019). CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature*, 568(7750), 112-116. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1054-1>
- Han, J., Tam, K., Tam, C., Hollis, R. P., & Kohn, D. B. (2021). Improved lentiviral vector titers from a multi-gene knockout packaging line. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 23, 582-592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.012>
- Han, S., Huang, K., Gu, Z., & Wu, J. (2020). Tumor immune microenvironment modulation-based drug delivery strategies for cancer immunotherapy. *Nanoscale*, 12(2), 413-436. <https://doi.org/10.1039/c9nr08086d>
- Han, X., Wang, Y., Wei, J., & Han, W. (2019). Multi-antigen-targeted chimeric antigen receptor T cells for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0813-7>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Handy, C. E., & Antonarakis, E. S. (2018). Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncology*, 14(10), 907-917. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0531>
- Hartweger, H., McGuire, A. T., Horning, M., Taylor, J. J., Dosenovic, P., Yost, D., Gazumyan, A., Seaman, M. S., Stamatatos, L., Jankovic, M., & Nussenzweig, M. C. (2019). HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J Exp Med*, 216(6), 1301-1310. <https://doi.org/10.1084/jem.20190287>
- Hassani, M., Hajari Taheri, F., Sharifzadeh, Z., Arashkia, A., Hadjati, J., van Weerden, W. M., Modarressi, M. H., & Abolhassani, M. (2019). Construction of a chimeric antigen receptor bearing a nanobody against prostate a specific membrane antigen in prostate cancer. *J Cell Biochem*, 120(6), 10787-10795. <https://doi.org/10.1002/jcb.28370>
- Herrera, F. G., Bourhis, J., & Coukos, G. (2017). Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 65-85. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21358>
- Ho, J. Y., Wang, L., Liu, Y., Ba, M., Yang, J., Zhang, X., Chen, D., Lu, P., & Li, J. (2021). Promoter usage regulating the surface density of CAR molecules may modulate the kinetics of CAR-T cells in vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 21, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.007>

- Hombach, A. A., Chmielewski, M., Rappl, G., & Abken, H. (2013). Adoptive immunotherapy with redirected T cells produces CCR7- cells that are trapped in the periphery and benefit from combined CD28-OX40 costimulation. *Hum Gene Ther*, 24(3), 259-269. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.247>
- Hosein, A. N., Dougan, S. K., Aguirre, A. J., & Maitra, A. (2022). Translational advances in pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Nature Cancer*, 3(3), 272-286. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00349-2>
- Hoshino, T., Wiltrott, R. H., & Young, H. A. (1999). IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol*, 162(9), 5070-5077. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227975>
- Hoskin, P. (2002). The price of anticancer intervention. Secondary malignancies after radiotherapy. *Lancet Oncol*, 3(9), 577-578.
- Hoteit, M., Oneissi, Z., Reda, R., Wakim, F., Zaidan, A., Farran, M., Abi-Khalil, E., & El-Sibai, M. (2021). Cancer immunotherapy: A comprehensive appraisal of its modes of application (Review). *Oncol Lett*, 22(3), 655. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12916>
- Hoyos, V., Savoldo, B., Quintarelli, C., Mahendravada, A., Zhang, M., Vera, J., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2010). Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*, 24(6), 1160-1170. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.75>
- Hu, B., Ren, J., Luo, Y., Keith, B., Young, R. M., Scholler, J., Zhao, Y., & June, C. H. (2017). Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18. *Cell Rep*, 20(13), 3025-3033. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.002>
- Huan, T., Chen, D., Liu, G., Zhang, H., Wang, X., Wu, Z., Wu, Y., Xu, Q., & Yu, F. (2022). Activation-induced cell death in CAR-T cell therapy. *Hum Cell*, 35(2), 441-447. <https://doi.org/10.1007/s13577-022-00670-z>
- Huang, P. W., & Chang, J. W. (2019). Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomed J*, 42(5), 299-306. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.09.002>
- Hurton, L. V., Singh, H., Najjar, A. M., Switzer, K. C., Mi, T., Maiti, S., Olivares, S., Rabinovich, B., Huls, H., Forget, M. A., Datar, V., Kebriaei, P., Lee, D. A., Champlin, R. E., & Cooper, L. J. (2016). 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*, 113(48), E7788-E7797. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610544113>
- Iguchi, E., Safgren, S. L., Marks, D. L., Olson, R. L., & Fernandez-Zapico, M. E. (2016). Pancreatic Cancer, A Mis-interpreter of the Epigenetic Language. *Yale J Biol Med*, 89(4), 575-590.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell

- death. *EMBO J*, 11(11), 3887-3895. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>
- Ishii, G., Ochiai, A., & Neri, S. (2016). Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, 186-196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.07.007>
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12293-12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>
- Jaspers, J. E., Khan, J. F., Godfrey, W. D., Lopez, A. V., Ciampricotti, M., Rudin, C. M., & Brentjens, R. J. (2023). IL-18-secreting CAR T cells targeting DLL3 are highly effective in small cell lung cancer models. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI166028>
- Jiménez-Reinoso, A., Tirado, N., Martínez-Moreno, A., Díaz, V. M., García-Peydró, M., Hangiu, O., Díez-Alonso, L., Albitre, Á., Penela, P., Toribio, M. L., Menéndez, P., Álvarez-Vallina, L., & Sánchez Martínez, D. (2022). Efficient preclinical treatment of cortical T cell acute lymphoblastic leukemia with T lymphocytes secreting anti-CD1a T cell engagers. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(12), e005333. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005333>
- Johnson, B. A., III, Yarchoan, M., Lee, V., Laheru, D. A., & Jaffee, E. M. (2017). Strategies for Increasing Pancreatic Tumor Immunogenicity. *Clinical Cancer Research*, 23(7), 1656-1669. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-16-2318>
- Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 12(11), 749-761. <https://doi.org/10.1038/nri3307>
- Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C. H., Saso, K., Butler, M. O., Minden, M. D., & Hirano, N. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*, 24(3), 352-359. <https://doi.org/10.1038/nm.4478>
- Kang, J. S., Bae, S. Y., Kim, H. R., Kim, Y. S., Kim, D. J., Cho, B. J., Yang, H. K., Hwang, Y. I., Kim, K. J., Park, H. S., Hwang, D. H., Cho, D. J., & Lee, W. J. (2009). Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis*, 30(12), 1987-1996. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp158>
- Kankeu Fonkoua, L. A., Sirpilla, O., Sakemura, R., Siegler, E. L., & Kenderian, S. S. (2022). CAR T cell therapy and the tumor microenvironment: Current challenges and opportunities. *Mol Ther Oncolytics*, 25, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.03.009>
- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., & Schellhammer, P. F. (2010). Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(5), 411-422. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>

- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7556-7561. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.95.13.7556>
- Kerker, S. P., Goldszmid, R. S., Muranski, P., Chinnasamy, D., Yu, Z., Reger, R. N., Leonardi, A. J., Morgan, R. A., Wang, E., Marincola, F. M., Trinchieri, G., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2011). IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J Clin Invest*, 121(12), 4746-4757. <https://doi.org/10.1172/JCI58814>
- Kessler, J., Reiners, K. S., Sauer, M., Engert, A., & von Strandmann, E. P. (2011). NK Cells in Hodgkin Lymphoma Are Impaired but Can Be Activated. *Blood*, 118(21), 2182-2182. <https://doi.org/10.1182/blood.V118.21.2182.2182>
- Khan, A. N., Chowdhury, A., Karulkar, A., Jaiswal, A. K., Banik, A., Asija, S., & Purwar, R. (2022). Immunogenicity of CAR-T Cell Therapeutics: Evidence, Mechanism and Mitigation. *Front Immunol*, 13, 886546. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.886546>
- Khan, M., Maker, A. V., & Jain, S. (2021). The Evolution of Cancer Immunotherapy. *Vaccines*, 9(6), 614. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/6/614>
- Khong, H. T., & Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature Immunology*, 3(11), 999-1005. <https://doi.org/10.1038/ni1102-999>
- Kim, J., & Bae, J.-S. (2016). Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, 2016, 6058147. <https://doi.org/10.1155/2016/6058147>
- Kim, P. W., Sun, Z.-Y. J., Blacklow, S. C., Wagner, G., & Eck, M. J. (2003). A Zinc Clasp Structure Tethers Lck to T Cell Coreceptors CD4 and CD8. *Science*, 301(5640), 1725-1728. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1085643>
- Kimbrel, E. A., & Lanza, R. (2020). Next-generation stem cells - ushering in a new era of cell-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*, 19(7), 463-479. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0064-x>
- Kimura, M. Y., Pobeziński, L. A., Guintier, T. I., Thomas, J., Adams, A., Park, J. H., Tai, X., & Singer, A. (2013). IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8(+) T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat Immunol*, 14(2), 143-151. <https://doi.org/10.1038/ni.2494>
- Klichinsky, M., Ruella, M., Shestova, O., Lu, X. M., Best, A., Zeeman, M., Schmierer, M., Gabrusiewicz, K., Anderson, N. R., Petty, N. E., Cummins, K. D., Shen, F., Shan, X., Veliz, K., Blouch, K., Yashiro-Ohtani, Y., Kenderian, S. S., Kim, M. Y., O'Connor, R. S., . . . Gill, S. (2020). Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol*, 38(8), 947-953. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0462-y>
- Koneru, M., Purdon, T. J., Spriggs, D., Koneru, S., & Brentjens, R. J. (2015). IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in

vivo. *Oncoimmunology*, 4(3), e994446.
<https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.994446>

- Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L., & Anderson, D. G. (2019). Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther*, 27(4), 710-728. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>
- Krenciute, G., Prinzing, B. L., Yi, Z., Wu, M. F., Liu, H., Dotti, G., Balyasnikova, I. V., & Gottschalk, S. (2017). Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Ralpha2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer Immunol Res*, 5(7), 571-581. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-16-0376>
- Kuhns, M. S., & Badgandi, H. B. (2012). Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes. *Immunological Reviews*, 250(1), 120-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imr.12000>
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202-213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., & Sutton, R. E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 12(15), 1893-1905. <https://doi.org/10.1089/104303401753153947>
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*, 37(3), 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., . . . Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526(7574), 525-530. <https://doi.org/10.1038/nature15395>
- Lange, S., Sand, L. G. L., Bell, M., Patil, S. L., Langfitt, D., & Gottschalk, S. (2021). A Chimeric GM-CSF/IL18 Receptor to Sustain CAR T-cell Function. *Cancer Discov*, 11(7), 1661-1671. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0896>
- Larson, R. C., Kann, M. C., Bailey, S. R., Haradhvala, N. J., Llopis, P. M., Bouffard, A. A., Scarfo, I., Leick, M. B., Grauwet, K., Berger, T. R., Stewart, K., Anekal, P. V., Jan, M., Joung, J., Schmidts, A., Ouspenskaia, T., Law, T., Regev, A., Getz, G., & Maus, M. V. (2022). CAR T cell killing requires the IFNgammaR pathway in solid but not liquid tumours. *Nature*, 604(7906), 563-570. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04585-5>
- Ledbetter, J. A., & Linsley, P. S. (1998). CD28. In P. J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* (pp. 482-483). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0126>
- Lei, X., Lei, Y., Li, J.-K., Du, W.-X., Li, R.-G., Yang, J., Li, J., Li, F., & Tan, H.-B. (2020). Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in

- cancer immunotherapy. *Cancer Letters*, 470, 126-133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>
- Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., & Ryan, J. L. (1997). Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*, 90(7), 2541-2548. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326219>
- Li, A., Song, N. J., Riesenber, B. P., & Li, Z. (2019). The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Front Immunol*, 10, 3154. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03154>
- Li, J., Li, W., Huang, K., Zhang, Y., Kupfer, G., & Zhao, Q. (2018). Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *J Hematol Oncol*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0568-6>
- Li, X., Daniyan, A. F., Lopez, A. V., Purdon, T. J., & Brentjens, R. J. (2021). Cytokine IL-36gamma improves CAR T-cell functionality and induces endogenous antitumor response. *Leukemia*, 35(2), 506-521. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0874-1>
- Li, X., Ding, Y., Zi, M., Sun, L., Zhang, W., Chen, S., & Xu, Y. (2017). CD19, from bench to bedside. *Immunol Lett*, 183, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.01.010>
- Liu, S., Liu, X., Zhang, C., Shan, W., & Qiu, X. (2021). T-Cell Exhaustion Status Under High and Low Levels of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression in Glioma [Original Research]. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.711772>
- Liu, Y. P., & Berkhout, B. (2014). HIV-1-based lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*, 1087, 273-284. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_22
- Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J. P., Walker, A. J., Kohler, M. E., Venkateshwara, V. R., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J., & Mackall, C. L. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*, 21(6), 581-590. <https://doi.org/10.1038/nm.3838>
- Lopez-Cantillo, G., Uruena, C., Camacho, B. A., & Ramirez-Segura, C. (2022). CAR-T Cell Performance: How to Improve Their Persistence? *Front Immunol*, 13, 878209. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878209>
- Lorenzo, J. (2016). Chapter 9 - The Effects of Immune Cell Products (Cytokines and Hematopoietic Cell Growth Factors) on Bone Cells. In J. Lorenzo, M. C. Horowitz, Y. Choi, H. Takayanagi, & G. Schett (Eds.), *Osteoimmunology (Second Edition)* (pp. 143-167). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800571-2.00009-8>
- Lu, J., & Jiang, G. (2022). The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Molecular Cancer*, 21(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01663-0>

- Lu, Z., Zheng, X., Ding, C., Zou, Z., Liang, Y., Zhou, Y., & Li, X. (2022). Deciphering the Biological Effects of Radiotherapy in Cancer Cells. *Biomolecules*, 12(9), 1167. <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/9/1167>
- Lytle, N. K., Barber, A. G., & Reya, T. (2018). Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nature Reviews Cancer*, 18(11), 669-680. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x>
- MacIver, N. J., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2013). Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 259-283. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- Magnani, C. F., Gaipa, G., Lussana, F., Belotti, D., Gritti, G., Napolitano, S., Matera, G., Cabiati, B., Buracchi, C., Borleri, G., Fazio, G., Zaninelli, S., Tettamanti, S., Cesana, S., Colombo, V., Quaroni, M., Cazzaniga, G., Rovelli, A., Biagi, E., . . . Biondi, A. (2020). Sleeping Beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities. *J Clin Invest*, 130(11), 6021-6033. <https://doi.org/10.1172/JCI138473>
- Maldonado-Perez, N., Tristan-Manzano, M., Justicia-Lirio, P., Martinez-Planes, E., Munoz, P., Pavlovic, K., Cortijo-Gutierrez, M., Blanco-Benitez, C., Castella, M., Juan, M., Wenes, M., Romero, P., Molina-Estevez, F. J., Maranon, C., Herrera, C., Benabdellah, K., & Martin, F. (2022). Efficacy and safety of universal (TCRKO) ARI-0001 CAR-T cells for the treatment of B-cell lymphoma. *Front Immunol*, 13, 1011858. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011858>
- Mariuzza, R. A., Agnihotri, P., & Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *Journal of Biological Chemistry*, 295(4), 914-925. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49904-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49904-2)
- Markley, J. C., & Sadelain, M. (2010). IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood*, 115(17), 3508-3519. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241398>
- Marodon, G., Mouly, E., Blair, E. J., Frisen, C., Lemoine, F. M., & Klatzmann, D. (2003). Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. *Blood*, 101(9), 3416-3423. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0578>
- Martin-Otal, C., Lasarte-Cia, A., Serrano, D., Casares, N., Conde, E., Navarro, F., Sanchez-Moreno, I., Gorraiz, M., Sarrion, P., Calvo, A., De Andrea, C. E., Echeveste, J., Vilas, A., Rodriguez-Madoz, J. R., San Miguel, J., Prosper, F., Hervas-Stubbs, S., Lasarte, J. J., & Lozano, T. (2022). Targeting the extra domain A of fibronectin for cancer therapy with CAR-T cells. *J Immunother Cancer*, 10(8). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004479>
- Mastelic-Gavillet, B., Balint, K., Boudousquie, C., Gannon, P. O., & Kandalaf, L. E. (2019). Personalized Dendritic Cell Vaccines—Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00766>

- Mateos, M.-V., Nooka, A. K., & Larson, S. M. (2022). Moving Toward a Cure for Myeloma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*(42), 643-654. https://doi.org/10.1200/edbk_349603
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., . . . Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378(5), 439-448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>
- Maus, M. V., Haas, A. R., Beatty, G. L., Albelda, S. M., Levine, B. L., Liu, X., Zhao, Y., Kalos, M., & June, C. H. (2013). T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*, 1(1), 26-31. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0006>
- Mazinani, M., & Rahbarizadeh, F. (2022). CAR-T cell potency: from structural elements to vector backbone components. *Biomark Res*, 10(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00417-w>
- McMurchy, A. N., Gillies, J., Gizzi, M. C., Riba, M., Garcia-Manteiga, J. M., Cittaro, D., Lazarevic, D., Di Nunzio, S., Piras, I. S., Bulfone, A., Roncarolo, M. G., Stupka, E., Bacchetta, R., & Levings, M. K. (2013). A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells. *Blood*, 121(8), 1265-1275. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431023>
- Melenhorst, J. J., Chen, G. M., Wang, M., Porter, D. L., Chen, C., Collins, M. A., Gao, P., Bandyopadhyay, S., Sun, H., Zhao, Z., Lundh, S., Pruteanu-Malinici, I., Nobles, C. L., Maji, S., Frey, N. V., Gill, S. I., Loren, A. W., Tian, L., Kulikovskaya, I., . . . June, C. H. (2022). Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature*, 602(7897), 503-509. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04390-6>
- Mian, A., & Hill, B. T. (2021). Brexucabtagene autoleucel for the treatment of relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Expert Opin Biol Ther*, 21(4), 435-441. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1889510>
- Micklethwaite, K. P., Gowrishankar, K., Gloss, B. S., Li, Z., Street, J. A., Moezzi, L., Mach, M. A., Sutrave, G., Clancy, L. E., Bishop, D. C., Louie, R. H. Y., Cai, C., Foox, J., MacKay, M., Sedlazeck, F. J., Blombery, P., Mason, C. E., Luciani, F., Gottlieb, D. J., & Blyth, E. (2021). Investigation of product-derived lymphoma following infusion of piggyBac-modified CD19 chimeric antigen receptor T cells. *Blood*, 138(16), 1391-1405. <https://doi.org/10.1182/blood.2021010858>
- Miller, J., Baker, C., Cook, K., Graf, B., Sanchez-Lockhart, M., Sharp, K., Wang, X., Yang, B., & Yoshida, T. (2009). Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res*, 45(2-3), 159-172. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8097-6>
- Miller, J. S., Morishima, C., McNeel, D. G., Patel, M. R., Kohrt, H. E. K., Thompson, J. A., Sondel, P. M., Wakelee, H. A., Disis, M. L., Kaiser, J. C., Cheever, M. A., Streicher, H., Creekmore, S. P., Waldmann, T. A., & Conlon, K. C. (2018). A First-in-Human Phase I Study of Subcutaneous Outpatient Recombinant Human IL15 (rhIL15) in Adults with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 24(7), 1525-1535. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2451>

- Mizushima, S., & Nagata, S. (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res*, 18(17), 5322. <https://doi.org/10.1093/nar/18.17.5322>
- Mo, F., Duan, S., Jiang, X., Yang, X., Hou, X., Shi, W., Carlos, C. J. J., Liu, A., Yin, S., Wang, W., Yao, H., Yu, Z., Tang, Z., Xie, S., Ding, Z., Zhao, X., Hammock, B. D., & Lu, X. (2021). Nanobody-based chimeric antigen receptor T cells designed by CRISPR/Cas9 technology for solid tumor immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 80. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00462-1>
- Momotow, J., Borchmann, S., Eichenauer, D. A., Engert, A., & Sasse, S. (2021). Hodgkin Lymphoma—Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. *Journal of Clinical Medicine*, 10(5), 1125. <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/5/1125>
- Monjezi, R., Miskey, C., Gogishvili, T., Schleef, M., Schmeer, M., Einsele, H., Ivics, Z., & Hudecek, M. (2017). Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia*, 31(1), 186-194. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.180>
- Monteran, L., & Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>
- Moretti, A., Ponzo, M., Nicolette, C. A., Tcherepanova, I. Y., Biondi, A., & Magnani, C. F. (2022). The Past, Present, and Future of Non-Viral CAR T Cells. *Front Immunol*, 13, 867013. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867013>
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A., & Rosenberg, S. A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314(5796), 126-129. <https://doi.org/10.1126/science.1129003>
- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., & Rosenberg, S. A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 18(4), 843-851. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.24>
- Morimoto, M., & Kopan, R. (2009). rTA toxicity limits the usefulness of the SP-C-rTA transgenic mouse. *Dev Biol*, 325(1), 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.013>
- Moritz, D., & Groner, B. (1995). A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther*, 2(8), 539-546. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593604>
- Moroz, A., Eppolito, C., Li, Q., Tao, J., Clegg, C. H., & Shrikant, P. A. (2004). IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol*, 173(2), 900-909. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.900>

- Munshi, N. C., Anderson, L. D., Jr., Shah, N., Madduri, D., Berdeja, J., Lonial, S., Raje, N., Lin, Y., Siegel, D., Oriol, A., Moreau, P., Yakoub-Agha, I., Delforge, M., Cavo, M., Einsele, H., Goldschmidt, H., Weisel, K., Rambaldi, A., Reece, D., . . . San-Miguel, J. (2021). Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 384(8), 705-716. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024850>
- Neelapu, S. S., Dickinson, M., Munoz, J., Ulrickson, M. L., Thieblemont, C., Oluwole, O. O., Herrera, A. F., Ujjani, C. S., Lin, Y., Riedell, P. A., Kekre, N., de Vos, S., Lui, C., Milletti, F., Dong, J., Xu, H., & Chavez, J. C. (2022). Axicabtagene ciloleucel as first-line therapy in high-risk large B-cell lymphoma: the phase 2 ZUMA-12 trial. *Nat Med*, 28(4), 735-742. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01731-4>
- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(6), 333-348. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x>
- Ng, W. L., Ansell, S. M., & Mondello, P. (2022). Insights into the tumor microenvironment of B cell lymphoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 362. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02579-9>
- Nienhuis, A. W., & Persons, D. A. (2012). Development of gene therapy for thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011833>
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Hofer, T., Viola, A., & Acuto, O. (2010). Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, 32(6), 766-777. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>
- Nishio, N., Diaconu, I., Liu, H., Cerullo, V., Caruana, I., Hoyos, V., Bouchier-Hayes, L., Savoldo, B., & Dotti, G. (2014). Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. *Cancer Res*, 74(18), 5195-5205. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0697>
- O'Rourke, D. M., Nasrallah, M. P., Desai, A., Melenhorst, J. J., Mansfield, K., Morrisette, J. J. D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S. F., Navenot, J. M., Zheng, Z., Levine, B. L., Okada, H., June, C. H., . . . Maus, M. V. (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*, 9(399). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0984>
- O'Shea, J. J., Lahesmaa, R., Vahedi, G., Laurence, A., & Kanno, Y. (2011). Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 11(4), 239-250. <https://doi.org/10.1038/nri2958>
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 151-167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>

- Ode, Z., Condori, J., Peterson, N., Zhou, S., & Krenciute, G. (2020). CRISPR-Mediated Non-Viral Site-Specific Gene Integration and Expression in T Cells: Protocol and Application for T-Cell Therapy. *Cancers (Basel)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061704>
- Ogasawara, K., Dodds, M., Mack, T., Lymp, J., Dell'Aringa, J., & Smith, J. (2021). Population Cellular Kinetics of Lisocabtagene Maraleucel, an Autologous CD19-Directed Chimeric Antigen Receptor T-Cell Product, in Patients with Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma. *Clin Pharmacokinet*, 60(12), 1621-1633. <https://doi.org/10.1007/s40262-021-01039-5>
- Orth, M., Metzger, P., Gerum, S., Mayerle, J., Schneider, G., Belka, C., Schnurr, M., & Lauber, K. (2019). Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiation Oncology*, 14(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6>
- Ortiz-Maldonado, V., Rives, S., Castella, M., Alonso-Saladrigues, A., Benitez-Ribas, D., Caballero-Banos, M., Baumann, T., Cid, J., Garcia-Rey, E., Llanos, C., Torreadell, M., Villamor, N., Gine, E., Diaz-Beya, M., Guardia, L., Montoro, M., Catala, A., Faura, A., Gonzalez, E. A., . . . Delgado, J. (2021). CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19(+) Relapsed/Refractory Malignancies. *Mol Ther*, 29(2), 636-644. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.027>
- Paijens, S. T., Vledder, A., de Bruyn, M., & Nijman, H. W. (2021). Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*, 18(4), 842-859. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00565-9>
- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M., & Young, L. S. (1991). Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *The Lancet*, 337(8737), 320-322. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90943-J](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90943-J)
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J. S., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., & Singer, A. (2004). Suppression of IL7Ra Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines: A Novel Mechanism for Maximizing IL-7-Dependent T Cell Survival. *Immunity*, 21(2), 289-302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.016>
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, 326(9), 851-862. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>
- Pena-Blanco, A., & Garcia-Saez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*, 285(3), 416-431. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>
- Perl, A. K., Zhang, L., & Whitsett, J. A. (2009). Conditional expression of genes in the respiratory epithelium in transgenic mice: cautionary notes and toward building a better mouse trap. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40(1), 1-3. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0011ED>

- Perna, S. K., Pagliara, D., Mahendravada, A., Liu, H., Brenner, M. K., Savoldo, B., & Dotti, G. (2014). Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirected cytotoxic T lymphocytes (CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition. *Clin Cancer Res*, 20(1), 131-139. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1016>
- Petrella, A., Doti, I., Agosti, V., Giarrusso, P. C., Vitale, D., Bond, H. M., Cuomo, C., Tassone, P., Franco, B., Ballabio, A., Venuta, S., & Morrone, G. (1998). A 5' regulatory sequence containing two Ets motifs controls the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene in human hematopoietic cells. *Blood*, 91(12), 4554-4560. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616151>
- Porcellini, S., Asperti, C., Corna, S., Cicoria, E., Valtolina, V., Stornaiuolo, A., Valentinis, B., Bordignon, C., & Traversari, C. (2020). CAR T Cells Redirected to CD44v6 Control Tumor Growth in Lung and Ovary Adenocarcinoma Bearing Mice. *Front Immunol*, 11, 99. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00099>
- Porter, D. L., Hwang, W. T., Frey, N. V., Lacey, S. F., Shaw, P. A., Loren, A. W., Bagg, A., Marcucci, K. T., Shen, A., Gonzalez, V., Ambrose, D., Grupp, S. A., Chew, A., Zheng, Z., Milone, M. C., Levine, B. L., Melnhorst, J. J., & June, C. H. (2015). Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 7(303), 303ra139. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5415>
- Pramanik, J., Chen, X., Kar, G., Henriksson, J., Gomes, T., Park, J. E., Natarajan, K., Meyer, K. B., Miao, Z., McKenzie, A. N. J., Mahata, B., & Teichmann, S. A. (2018). Genome-wide analyses reveal the IRE1a-XBP1 pathway promotes T helper cell differentiation by resolving secretory stress and accelerating proliferation. *Genome Med*, 10(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0589-3>
- Priceman, S. J., Gerdtts, E. A., Tilakawardane, D., Kennewick, K. T., Murad, J. P., Park, A. K., Jeang, B., Yamaguchi, Y., Yang, X., Urak, R., Weng, L., Chang, W. C., Wright, S., Pal, S., Reiter, R. E., Wu, A. M., Brown, C. E., & Forman, S. J. (2018). Co-stimulatory signaling determines tumor antigen sensitivity and persistence of CAR T cells targeting PSCA+ metastatic prostate cancer. *Oncoimmunology*, 7(2), e1380764. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1380764>
- Qin, L., Lai, Y., Zhao, R., Wei, X., Weng, J., Lai, P., Li, B., Lin, S., Wang, S., Wu, Q., Liang, Q., Li, Y., Zhang, X., Wu, Y., Liu, P., Yao, Y., Pei, D., Du, X., & Li, P. (2017). Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *J Hematol Oncol*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0437-8>
- Querques, I., Mades, A., Zuliani, C., Miskey, C., Alb, M., Grueso, E., Machwirth, M., Rausch, T., Einsele, H., Ivics, Z., Hudecek, M., & Barabas, O. (2019). A highly soluble Sleeping Beauty transposase improves control of gene insertion. *Nature Biotechnology*, 37(12), 1502-1512. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0291-z>
- Quijano-Rubio, A., Ulge, U. Y., Walkey, C. D., & Silva, D. A. (2020). The advent of de novo proteins for cancer immunotherapy. *Curr Opin Chem Biol*, 56, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.02.002>

- Rad, S. M. A., Poudel, A., Tan, G. M. Y., & McLellan, A. D. (2020). Promoter choice: Who should drive the CAR in T cells? *PLoS One*, 15(7), e0232915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232915>
- Ramakrishna, S., Highfill, S. L., Walsh, Z., Nguyen, S. M., Lei, H., Shern, J. F., Qin, H., Kraft, I. L., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Hwang, J. D., Feng, Y., Zhu, Z., Dimitrov, D., Shah, N. N., & Fry, T. J. (2019). Modulation of Target Antigen Density Improves CAR T-cell Functionality and Persistence. *Clin Cancer Res*, 25(17), 5329-5341. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3784>
- Ramezani, A., & Hawley, R. G. (2002). Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 16, Unit 16 21. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1621s60>
- Razi Soofiyani, S., Baradaran, B., Lotfipour, F., Kazemi, T., & Mohammadnejad, L. (2013). Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull*, 3(2), 249-255. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.041>
- Redmond, W. L., Ruby, C. E., & Weinberg, A. D. (2009). The role of OX40-mediated costimulation in T-cell activation and survival. *Crit Rev Immunol*, 29(3), 187-201. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v29.i3.10>
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338(6214), 383-384. <https://doi.org/10.1038/338383b0>
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J. (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 175-196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
- Robbins, P. D., & Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther*, 80(1), 35-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804053>
- Robertson, M. J., Kirkwood, J. M., Logan, T. F., Koch, K. M., Kathman, S., Kirby, L. C., Bell, W. N., Thurmond, L. M., Weisenbach, J., & Dar, M. M. (2008). A dose-escalation study of recombinant human interleukin-18 using two different schedules of administration in patients with cancer. *Clin Cancer Res*, 14(11), 3462-3469. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4740>
- Rodriguez-Garcia, A., Palazon, A., Noguera-Ortega, E., Powell, D. J., Jr., & Guedan, S. (2020). CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Front Immunol*, 11, 1109. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01109>
- Rodriguez-Marquez, P., Calleja-Cervantes, M. E., Serrano, G., Oliver-Caldes, A., Palacios-Berraquero, M. L., Martin-Mallo, A., Calvino, C., Espanol-Rego, M., Ceballos, C., Lozano, T., San Martin-Uriz, P., Vilas-Zornoza, A., Rodriguez-Diaz, S., Martinez-Turrillas, R., Jauregui, P., Alignani, D., Viguria, M. C., Redondo, M., Pascal, M., . . . Prosper, F. (2022). CAR density influences antitumoral efficacy of BCMA CAR T cells and correlates with clinical outcome. *Sci Adv*, 8(39), eabo0514. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo0514>
- Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., & Ochoa, A. C. (2009). Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells

in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer Research*, 69(4), 1553-1560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-1921>

- Romano, G. (2012). Development of safer gene delivery systems to minimize the risk of insertional mutagenesis-related malignancies: a critical issue for the field of gene therapy. *ISRN Oncol*, 2012, 616310. <https://doi.org/10.5402/2012/616310>
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., & et al. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*, 313(23), 1485-1492. <https://doi.org/10.1056/NEJM198512053132327>
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., & et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*, 319(25), 1676-1680. <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527>
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., & Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, 233(4770), 1318-1321. <https://doi.org/10.1126/science.3489291>
- Roshani, R., McCarthy, F., & Hagemann, T. (2014). Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 345(2), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.014>
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., & Rabinovich, G. A. (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, 5(3), 241-251. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00024-8)
- Ruella, M., Xu, J., Barrett, D. M., Fraietta, J. A., Reich, T. J., Ambrose, D. E., Klichinsky, M., Shestova, O., Patel, P. R., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Bhoj, V. G., Orlando, E. J., Fry, T. J., Bitter, H., Maude, S. L., Levine, B. L., Nobles, C. L., Bushman, F. D., . . . Melenhorst, J. J. (2018). Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med*, 24(10), 1499-1503. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0201-9>
- Sadelain, M., Brentjens, R., & Riviere, I. (2009). The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol*, 21(2), 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.02.009>
- Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P., Ahmadi Najafabadi, M., Yousefi, F., Mirarefin, S. M. J., & Rahbarizadeh, F. (2022). Recent Advances in Solid Tumor CAR-T Cell Therapy: Driving Tumor Cells From Hero to Zero? *Front Immunol*, 13, 795164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.795164>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708-712. <https://doi.org/10.1038/44385>

- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., & Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*, 122(3), 899-910. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>
- Sanchez-Guijo, F., Avendano-Sola, C., Badimon, L., Bueren, J. A., Canals, J. M., Delgado, J., Delgado, J., Eguizabal, C., Fernandez-Santos, M. E., Garcia-Olmo, D., Gonzalez-Asequinolaza, G., Juan, M., Martin, F., Mata, R., Montserrat, N., Perez-Martinez, A., Perez-Simon, J. A., Prosper, F., Urbano-Ispizua, A., . . . Moraleda, J. M. (2023). Role of Hospital Exemption in Europe: position paper from the Spanish Advanced Therapy Network (TERAV). *Bone Marrow Transplant*. <https://doi.org/10.1038/s41409-023-01962-0>
- Sandoval-Villegas, N., Nurieva, W., Amberger, M., & Ivics, Z. (2021). Contemporary Transposon Tools: A Review and Guide through Mechanisms and Applications of Sleeping Beauty, piggyBac and Tol2 for Genome Engineering. *Int J Mol Sci*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/ijms22105084>
- Sawada, S., & Littman, D. R. (1991). Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene. *Mol Cell Biol*, 11(11), 5506-5515. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.11.5506-5515.1991>
- Sawalha, Y., & Maddocks, K. (2022). Novel treatments in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *BMJ*, 377, e063439. <https://doi.org/10.1136/bmj-2020-063439>
- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P., & Rice, C. M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, 472(7344), 481-485. <https://doi.org/10.1038/nature09907>
- Scholler, J., Brady, T. L., Binder-Scholl, G., Hwang, W. T., Plesa, G., Hege, K. M., Vogel, A. N., Kalos, M., Riley, J. L., Deeks, S. G., Mitsuyasu, R. T., Bernstein, W. B., Aronson, N. E., Levine, B. L., Bushman, F. D., & June, C. H. (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci Transl Med*, 4(132), 132ra153. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003761>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), 1565-1570. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1203486>
- Seliger, B., Maeurer, M. J., & Ferrone, S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunology Today*, 21(9), 455-464. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01692-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01692-3)
- Sessa, M., Lorioli, L., Fumagalli, F., Acquati, S., Redaelli, D., Baldoli, C., Canale, S., Lopez, I. D., Morena, F., Calabria, A., Fiori, R., Silvani, P., Rancoita, P. M., Gabaldo, M., Benedicenti, F., Antonioli, G., Assanelli, A., Cicalese, M. P., Del Carro, U., . . . Biffi, A. (2016). Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, 388(10043), 476-487. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30374-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30374-9)

- Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J., & Kazi, J. U. (2021). T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 412. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*, 161(2), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.030>
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 8(3), 239-245. <https://doi.org/10.1038/ni1443>
- Shibata, M., & Hoque, M. O. (2019). Targeting Cancer Stem Cells: A Strategy for Effective Eradication of Cancer. *Cancers*, 11(5), 732. <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/5/732>
- Shum, T., Omer, B., Tashiro, H., Kruse, R. L., Wagner, D. L., Parikh, K., Yi, Z., Sauer, T., Liu, D., Parihar, R., Castillo, P., Liu, H., Brenner, M. K., Metelitsa, L. S., Gottschalk, S., & Rooney, C. M. (2017). Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells. *Cancer Discov*, 7(11), 1238-1247. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0538>
- Siegler, E. L., & Kenderian, S. S. (2020). Neurotoxicity and Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Insights Into Mechanisms and Novel Therapies. *Front Immunol*, 11, 1973. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01973>
- Singh, H., Srour, S. A., Milton, D. R., McCarty, J., Dai, C., Gaballa, M. R., Ammari, M., Olivares, S., Huls, H., De Groot, E., Marin, D., Petropoulos, D., Olson, A. L., Anderlini, P., Im, J. S., Khouri, I., Hosing, C. M., Rezvani, K., Champlin, R. E., . . . Kebriaei, P. (2022). Sleeping beauty generated CD19 CAR T-Cell therapy for advanced B-Cell hematological malignancies. *Front Immunol*, 13, 1032397. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1032397>
- Singh, R., Shaik, S., Negi, B. S., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Parihar, A. S., & Sharma, U. (2020). Non-Hodgkin's lymphoma: A review. *Journal of family medicine and primary care*, 9(4), 1834-1840. <https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc.1037.19>
- Singh, S., Khan, I., Khim, S., Seymour, B., Sommer, K., Wielgosz, M., Norgaard, Z., Kiem, H. P., Adair, J., Liggitt, D., Nienhuis, A., & Rawlings, D. J. (2017). Safe and Effective Gene Therapy for Murine Wiskott-Aldrich Syndrome Using an Insulated Lentiviral Vector. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 4, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.11.001>
- Sportes, C., Babb, R. R., Krumlauf, M. C., Hakim, F. T., Steinberg, S. M., Chow, C. K., Brown, M. R., Fleisher, T. A., Noel, P., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Engel, J., Buffet, R., Morre, M., Amato, R. J., Pecora, A., Mackall, C. L., & Gress, R. E. (2010). Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin Cancer Res*, 16(2), 727-735. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1303>
- Sportes, C., Hakim, F. T., Memon, S. A., Zhang, H., Chua, K. S., Brown, M. R., Fleisher, T. A., Krumlauf, M. C., Babb, R. R., Chow, C. K., Fry, T. J., Engels, J., Buffet, R., Morre, M., Amato, R. J., Venzon, D. J., Korngold, R., Pecora, A., Gress, R. E., & Mackall,

- C. L. (2008). Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med*, 205(7), 1701-1714. <https://doi.org/10.1084/jem.20071681>
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood cancer journal*, 11(4), 69. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Stoklasek, T. A., Schluns, K. S., & Lefrancois, L. (2006). Combined IL-15/IL-15 α immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol*, 177(9), 6072-6080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6072>
- Storm, H. H., Klint, Å., Tryggvadóttir, L., Gislum, M., Engholm, G., Bray, F., & Hakulinen, T. (2010). Trends in the survival of patients diagnosed with malignant neoplasms of lymphoid, haematopoietic, and related tissue in the Nordic countries 1964–2003 followed up to the end of 2006. *Acta Oncologica*, 49(5), 694-712. <https://doi.org/10.3109/02841861003631495>
- Strobel, O., Neoptolemos, J., Jäger, D., & Büchler, M. W. (2019). Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(1), 11-26. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0112-1>
- Tan, S., Li, D., & Zhu, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124, 109821. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>
- Teachey, D. T., Lacey, S. F., Shaw, P. A., Melenhorst, J. J., Maude, S. L., Frey, N., Pequignot, E., Gonzalez, V. E., Chen, F., Finklestein, J., Barrett, D. M., Weiss, S. L., Fitzgerald, J. C., Berg, R. A., Aplenc, R., Callahan, C., Rheingold, S. R., Zheng, Z., Rose-John, S., . . . Grupp, S. A. (2016). Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov*, 6(6), 664-679. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0040>
- Teppert, K., Wang, X., Anders, K., Evaristo, C., Lock, D., & Künkele, A. (2022). Joining Forces for Cancer Treatment: From “TCR versus CAR” to “TCR and CAR”. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14563. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/23/14563>
- Terabe, M., & Berzofsky, J. A. (2004). Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 16(2), 157-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.01.010>
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7(6), e577-e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S., von Bergwelt-Baildon, M., & Kobold, S. (2019). Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *British Journal of Cancer*, 120(1), 26-37. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0325-1>
- Trias, E., Juan, M., Urbano-Ispizua, A., & Calvo, G. (2022). The hospital exemption pathway for the approval of advanced therapy medicinal products: an

- underused opportunity? The case of the CAR-T ARI-0001. *Bone Marrow Transplantation*, 57(2), 156-159. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01463-y>
- Tristan-Manzano, M., Justicia-Lirio, P., Maldonado-Perez, N., Cortijo-Gutierrez, M., Benabdellah, K., & Martin, F. (2020). Externally-Controlled Systems for Immunotherapy: From Bench to Bedside. *Front Immunol*, 11, 2044. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02044>
- 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, F. J., Griesche, V., Marchal, J. A., Heras, S. R., Benabdellah, K., & Martin, F. Lentiviral vectors for the generation of inducible, transactivator-free Advanced Therapy Medicinal Products: application to CAR-T cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.018>
- Tristán-Manzano, M., Maldonado-Pérez, N., Justicia-Lirio, P., Muñoz, P., Cortijo-Gutiérrez, M., Pavlovic, K., Jiménez-Moreno, R., Noguerras, S., Carmona, M. D., Sánchez-Hernández, S., Aguilar-González, A., Castella, M., Juan, M., Marañón, C., Marchal, J. A., Benabdellah, K., Herrera, C., & Martin, F. (2022). Physiological lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 25, 335-349. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.05.003>
- Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J., & Hanash, S. M. (2016). The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Research*, 76(19), 5597-5601. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-16-0431>
- Tsutsui, H., Nakanishi, K., Matsui, K., Higashino, K., Okamura, H., Miyazawa, Y., & Kaneda, K. (1996). IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol*, 157(9), 3967-3973. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892629>
- Turtle, C. J., Riddell, S. R., & Maloney, D. G. (2016). CD19-Targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy for B-cell malignancies. *Clin Pharmacol Ther*, 100(3), 252-258. <https://doi.org/10.1002/cpt.392>
- Uslu, U., Da, T., Assenmacher, C. A., Scholler, J., Young, R. M., Tchou, J., & June, C. H. (2023). Chimeric antigen receptor T cells as adjuvant therapy for unresectable adenocarcinoma. *Sci Adv*, 9(2), eade2526. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade2526>
- Usmani, S. Z., Martin, T. G., Berdeja, J. G., Jakubowiak, A. J., Agha, M. E., Cohen, A. D., Deol, A., Htut, M., Lesokhin, A. M., Munshi, N. C., O'Donnell, E., Jackson, C. C., Yeh, T.-m., Banerjee, A., Zudaire, E., Madduri, D., Zhou, C., Bubuteishvili-Pacaud, L., Lin, Y., & Jagannath, S. (2022). Phase 1b/2 study of ciltacabtagene autoleucel, a BCMA-directed CAR-T cell therapy, in patients with relapsed/refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): Two years post-LPI. *Journal of Clinical Oncology*, 40(16_suppl), 8028-8028. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.8028
- van den Broek, T., Borghans, J. A. M., & van Wijk, F. (2018). The full spectrum of human naive T cells. *Nature Reviews Immunology*, 18(6), 363-373. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0001-y>

- van der Merwe, P. A., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P., & Davis, S. J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*, 185(3), 393-403. <https://doi.org/10.1084/jem.185.3.393>
- van Rosmalen, M., Krom, M., & Merckx, M. (2017). Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers To Allow Rational Design of Multidomain Proteins. *Biochemistry*, 56(50), 6565-6574. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00902>
- Vardhana, S., Choudhuri, K., Varma, R., & Dustin, M. L. (2010). Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity*, 32(4), 531-540. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.005>
- Vedvyas, Y., McCloskey, J. E., Yang, Y., Min, I. M., Fahey, T. J., Zarnegar, R., Hsu, Y. S., Hsu, J. M., Van Besien, K., Gaudet, I., Law, P., Kim, N. J., Hofe, E. V., & Jin, M. M. (2019). Manufacturing and preclinical validation of CAR T cells targeting ICAM-1 for advanced thyroid cancer therapy. *Sci Rep*, 9(1), 10634. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46938-7>
- Verneau, J., Sautés-Fridman, C., & Sun, C.-M. (2020). Dendritic cells in the tumor microenvironment: prognostic and theranostic impact. *Seminars in Immunology*, 48, 101410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101410>
- Vinay, D. S., Cha, K., & Kwon, B. S. (2006). Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling. *J Mol Med (Berl)*, 84(9), 726-736. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0072-2>
- Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2011). 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol*, 8(4), 281-284. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.82>
- Vink, C. A., Counsell, J. R., Perocheau, D. P., Karda, R., Buckley, S. M. K., Brugman, M. H., Galla, M., Schambach, A., McKay, T. R., Waddington, S. N., & Howe, S. J. (2017). Eliminating HIV-1 Packaging Sequences from Lentiviral Vector Proviruses Enhances Safety and Expedites Gene Transfer for Gene Therapy. *Mol Ther*, 25(8), 1790-1804. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.028>
- Vitale, I., Shema, E., Loi, S., & Galluzzi, L. (2021). Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy. *Nature Medicine*, 27(2), 212-224. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01233-9>
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., Johns, A. L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M. C. J., Robertson, A. J., Fadlullah, M. Z. H., Bruxner, T. J. C., Christ, A. N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., . . . Grimmond, S. M. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540), 495-501. <https://doi.org/10.1038/nature14169>
- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028472>
- Walker, A. J., Majzner, R. G., Zhang, L., Wanhainen, K., Long, A. H., Nguyen, S. M., Lopomo, P., Vigny, M., Fry, T. J., Orentas, R. J., & Mackall, C. L. (2017). Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor

- Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase. *Mol Ther*, 25(9), 2189-2201. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.008>
- Walter, R. B., Appelbaum, F. R., Estey, E. H., & Bernstein, I. D. (2012). Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 119(26), 6198-6208. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-325050>
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), 405-413. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-x)
- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2009). How Diverse—CD4 Effector T Cells and their Functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1(1), 20-36. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp001>
- Wan, Z., Shao, X., Ji, X., Dong, L., Wei, J., Xiong, Z., Liu, W., & Qi, H. (2020). Transmembrane domain-mediated Lck association underlies bystander and costimulatory ICOS signaling. *Cell Mol Immunol*, 17(2), 143-152. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0183-z>
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D., & Yu, H. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature Medicine*, 10(1), 48-54. <https://doi.org/10.1038/nm976>
- Wang, X., Zhao, X., Feng, C., Weinstein, A., Xia, R., Wen, W., Lv, Q., Zuo, S., Tang, P., Yang, X., Chen, X., Wang, H., Zang, S., Stollings, L., Denning, T. L., Jiang, J., Fan, J., Zhang, G., Zhang, X., . . . Lu, B. (2015). IL-36gamma Transforms the Tumor Microenvironment and Promotes Type 1 Lymphocyte-Mediated Antitumor Immune Responses. *Cancer Cell*, 28(3), 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.07.014>
- Wang, Y., Chen, M., Wu, Z., Tong, C., Dai, H., Guo, Y., Liu, Y., Huang, J., Lv, H., Luo, C., Feng, K. C., Yang, Q. M., Li, X. L., & Han, W. (2018). CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: A phase I trial. *Oncoimmunology*, 7(7), e1440169. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1440169>
- Wat, J., & Barmettler, S. (2022). Hypogammaglobulinemia After Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy: Characteristics, Management, and Future Directions. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 10(2), 460-466. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.10.037>
- Weber, E. W., Parker, K. R., Sotillo, E., Lynn, R. C., Anbunathan, H., Lattin, J., Good, Z., Belk, J. A., Daniel, B., Klysz, D., Malipatlolla, M., Xu, P., Bashti, M., Heitzeneder, S., Labanieh, L., Vandris, P., Majzner, R. G., Qi, Y., Sandor, K., . . . Mackall, C. L. (2021). Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science*, 372(6537). <https://doi.org/10.1126/science.aba1786>
- Whilding, L. M., Halim, L., Draper, B., Parente-Pereira, A. C., Zabinski, T., Davies, D. M., & Maher, J. (2019). CAR T-Cells Targeting the Integrin alphavbeta6 and Co-Expressing the Chemokine Receptor CXCR2 Demonstrate Enhanced Homing

- and Efficacy against Several Solid Malignancies. *Cancers (Basel)*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050674>
- Whitsett, J. A., & Perl, A. K. (2006). Conditional control of gene expression in the respiratory epithelium: A cautionary note. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34(5), 519-520. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F310>
- Wilkie, S., Burbridge, S. E., Chiapero-Stanke, L., Pereira, A. C., Cleary, S., van der Stegen, S. J., Spicer, J. F., Davies, D. M., & Maher, J. (2010). Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4. *J Biol Chem*, 285(33), 25538-25544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127951>
- Woo, S.-R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., Gravano, D. M., Vogel, P., Liu, C. L., Tansombatvisit, S., Grosso, J. F., Netto, G., Smeltzer, M. P., Chaux, A., Utz, P. J., Workman, C. J., Pardoll, D. M., Korman, A. J., . . . Vignali, D. A. A. (2012). Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Research*, 72(4), 917-927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-11-1620>
- Xia, A., Zhang, Y., Xu, J., Yin, T., & Lu, X.-J. (2019). T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01719>
- Xia, H., Wang, W., Crespo, J., Kryczek, I., Li, W., Wei, S., Bian, Z., Maj, T., He, M., Liu, R. J., He, Y., Rattan, R., Munkarah, A., Guan, J.-L., & Zou, W. (2017). Suppression of FIP200 and autophagy by tumor-derived lactate promotes naive T cell apoptosis and affects tumor immunity. *Science Immunology*, 2(17), eaan4631. <https://doi.org/doi:10.1126/sciimmunol.aan4631>
- Xu, X., Huang, W., Heczey, A., Liu, D., Guo, L., Wood, M., Jin, J., Courtney, A. N., Liu, B., Di Pierro, E. J., Hicks, J., Barragan, G. A., Ngai, H., Chen, Y., Savoldo, B., Dotti, G., & Metelitsa, L. S. (2019). NKT Cells Coexpressing a GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and IL15 Show Enhanced In Vivo Persistence and Antitumor Activity against Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 25(23), 7126-7138. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0421>
- Yan, B. X., & Sun, Y. Q. (1997). Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J Biol Chem*, 272(6), 3190-3194. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3190>
- Yanez, L., Sanchez-Escamilla, M., & Perales, M. A. (2019). CAR T Cell Toxicity: Current Management and Future Directions. *Hemasphere*, 3(2), e186. <https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000186>
- Yang, E. Y., & Shah, K. (2020). Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Front Oncol*, 10, 1182. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01182>
- Yang, X., Wang, G.-x., & Zhou, J.-f. (2019). CAR T Cell Therapy for Hematological Malignancies. *Current Medical Science*, 39(6), 874-882. <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2118-z>
- Yang, Z. Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A. J., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell

- exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, 122(4), 1271-1282. <https://doi.org/10.1172/JCI59806>
- Ying, Z., Huang, X. F., Xiang, X., Liu, Y., Kang, X., Song, Y., Guo, X., Liu, H., Ding, N., Zhang, T., Duan, P., Lin, Y., Zheng, W., Wang, X., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Zhang, C., Liu, W., . . . Chen, S. Y. (2019). A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med*, 25(6), 947-953. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0421-7>
- Ying, Z., Yang, H., Guo, Y., Li, W., Zou, D., Zhou, D., Wang, Z., Zhang, M., Wu, J., Liu, H., Zhang, P., Yang, S., Zhou, Z., Zheng, H., Song, Y., & Zhu, J. (2021). Relmacabtagene autoleucel (relma-cel) CD19 CAR-T therapy for adults with heavily pretreated relapsed/refractory large B-cell lymphoma in China. *Cancer Med*, 10(3), 999-1011. <https://doi.org/10.1002/cam4.3686>
- Yoshimoto, T., Mizutani, H., Tsutsui, H., Noben-Trauth, N., Yamanaka, K., Tanaka, M., Izumi, S., Okamura, H., Paul, W. E., & Nakanishi, K. (2000). IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol*, 1(2), 132-137. <https://doi.org/10.1038/77811>
- Zeng, R., Spolski, R., Casas, E., Zhu, W., Levy, D. E., & Leonard, W. J. (2007). The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood*, 109(10), 4135-4142. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054973>
- Zhang, C., He, J., Liu, L., Wang, J., Wang, S., Liu, L., Ge, J., Gao, L., Gao, L., Kong, P., Liu, Y., Liu, J., Han, Y., Zhang, Y., Sun, Z., Ye, X., Yin, W., Sersch, M., Shen, L., . . . Zhang, X. (2022). Novel CD19 chimeric antigen receptor T cells manufactured next-day for acute lymphoblastic leukemia. *Blood cancer journal*, 12(6), 96. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00688-4>
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>
- Zhang, E., Gu, J., & Xu, H. (2018). Prospects for chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for solid tumors. *Mol Cancer*, 17(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0759-3>
- Zhang, H. H., Song, K., Rabin, R. L., Hill, B. J., Perfetto, S. P., Roederer, M., Douek, D. C., Siegel, R. M., & Farber, J. M. (2010). CCR2 Identifies a Stable Population of Human Effector Memory CD4+ T Cells Equipped for Rapid Recall Response. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6646-6663. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904156>
- Zhang, J., Hu, Y., Yang, J., Li, W., Zhang, M., Wang, Q., Zhang, L., Wei, G., Tian, Y., Zhao, K., Chen, A., Tan, B., Cui, J., Li, D., Li, Y., Qi, Y., Wang, D., Wu, Y., Li, D., . . . Huang, H. (2022). Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*, 609(7926), 369-374. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05140-y>
- Zhang, L., Kerkar, S. P., Yu, Z., Zheng, Z., Yang, S., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2011). Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*, 19(4), 751-759. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.313>

- Zhang, L., Morgan, R. A., Beane, J. D., Zheng, Z., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Nahvi, A. V., Ngo, L. T., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Feldman, S. A., Toomey, M. A., Kerkar, S. P., Restifo, N. P., Yang, J. C., & Rosenberg, S. A. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 21(10), 2278-2288. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2085>
- Zhang, Q., Bi, J., Zheng, X., Chen, Y., Wang, H., Wu, W., Wang, Z., Wu, Q., Peng, H., Wei, H., Sun, R., & Tian, Z. (2018). Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nature Immunology*, 19(7), 723-732. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0132-0>
- Zhang, W., Xiao, D., Shan, L., Zhao, J., Mao, Q., & Xia, H. (2017). Generation of apoptosis-resistant HEK293 cells with CRISPR/Cas mediated quadruple gene knockout for improved protein and virus production. *Biotechnol Bioeng*, 114(11), 2539-2549. <https://doi.org/10.1002/bit.26382>
- Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*, 17(8), 807-821. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhang, Y., Zhuang, Q., Wang, F., Zhang, C., Xu, C., Gu, A., Zhong, W. H., Hu, Y., & Zhong, X. (2022). Co-expression IL-15 receptor alpha with IL-15 reduces toxicity via limiting IL-15 systemic exposure during CAR-T immunotherapy. *J Transl Med*, 20(1), 432. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03626-x>
- Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S. J. C., Perna, F., Kloss, C. C., Gunset, G., Plotkin, J., & Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*, 28(4), 415-428. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.004>
- Zhou, T., Damsky, W., Weizman, O. E., McGeary, M. K., Hartmann, K. P., Rosen, C. E., Fischer, S., Jackson, R., Flavell, R. A., Wang, J., Sanmamed, M. F., Bosenberg, M. W., & Ring, A. M. (2020). IL-18BP is a secreted immune checkpoint and barrier to IL-18 immunotherapy. *Nature*, 583(7817), 609-614. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2422-6>
- Zimmermann, K., Kuehle, J., Dragon, A. C., Galla, M., Kloth, C., Rudek, L. S., Sandalcioglu, I. E., Neyazi, B., Moritz, T., Meyer, J., Rossig, C., Altvater, B., Eiz-Vesper, B., Morgan, M. A., Abken, H., & Schambach, A. (2020). Design and Characterization of an "All-in-One" Lentiviral Vector System Combining Constitutive Anti-G(D2) CAR Expression and Inducible Cytokines. *Cancers (Basel)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/cancers12020375>

ANEXO I
PUBLICACIÓN
CIENTÍFICA

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 22 September 2021 (22.09.2021)

Information valid as of: 10 May 2022 (10.05.2022)

Report generated on: 14 March 2023 (14.03.2023)

(10) Publication number:

WO2022/058640

(43) Publication date:

24 March 2022 (24.03.2022)

(26) Publication language:

Spanish (ES)

(21) Application Number:

PCT/ES2021/070684

(22) Filing Date:

21 September 2021 (21.09.2021)

(25) Filing language:

Spanish (ES)

(31) Priority number(s):

P202030955 (ES)

(31) Priority date(s):

21 September 2020 (21.09.2020)

(31) Priority status:

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

P202030954 (ES)

21 September 2020 (21.09.2020)

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:

C12N 15/10 (2006.01); **C12N 15/86** (2006.01); **A61K 35/17** (2015.01); **A61P 35/00** (2006.01)

(71) Applicant(s):

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio, nº 15 41092 Sevilla (ES) (*for all designated states*)

(72) Inventor(s):

MARTÍN MOLINA, Francisco; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD Avda. Américo Vespucio, nº 15 41092 Sevilla (ES)

TRISTÁN MANZANO, María; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD Avda. Américo Vespucio, nº 15 41092 Sevilla (ES)

MALDONADO PÉREZ, Noelia; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD Avda. Américo Vespucio, nº 15 41092 Sevilla (ES)

JUSTICIA LIRIO, Pedro; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD Avda. Américo Vespucio, nº 15 41092 Sevilla (ES)

(74) Agent(s):

FUSTER, Gustavo; Paseo de la Castellana 140 3ª Planta, Edificio Lima 28046 Madrid (ES)

(54) Title (EN): POLYNUCLEOTIDE FOR PHYSIOLOGICAL EXPRESSION IN T-CELLS

(54) Title (FR): POLYNUCLÉOTIDE POUR L'EXPRESSION PHYSIOLOGIQUE DANS DES LYMPHOCYTES T

(54) Title (ES): POLINUCLEÓTIDO PARA EXPRESIÓN FISIOLÓGICA EN CÉLULAS T

(57) Abstract:

(EN): An improved system for generating immunotherapeutic T cells comprising a chimeric antigen receptor (CAR).

(FR): L'invention concerne un système amélioré pour générer des lymphocytes T immunothérapeutiques qui comprennent un récepteur antigénique chimérique (CAR).

(ES): Sistema mejorado para generar células T inmunoterapéuticas que comprenden un receptor de antígeno quimérico (CAR).

International search report:

Received at International Bureau: 11 January 2022 (11.01.2022) [ES]

International Report on Patentability (IPRP) Chapter II of the PCT:

Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW

European Patent Office (EPO) : AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
24 de marzo de 2022 (24.03.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/058640 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C12N 15/10 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)

C12N 15/86 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070684

(22) Fecha de presentación internacional:

21 de septiembre de 2021 (21.09.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030955 21 de septiembre de 2020 (21.09.2020) ES

P202030954 21 de septiembre de 2020 (21.09.2020) ES

(71) Solicitante: FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA

PROGRESO Y SALUD [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio, nº 15, 41092 Sevilla (ES).

(72) Inventores: MARTÍN MOLINA, Francisco; FUNDA-

CIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Avda. Américo Vespucio, nº 15, 41092 Sevilla (ES).

TRISTÁN MANZANO, María; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Avda. Américo Vespucio, nº 15, 41092 Sevilla (ES).

MALDONADO PÉREZ, Noelia; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Avda. Américo Vespucio, nº 15, 41092 Sevilla (ES).

JUSTICIA LIRIO, Pedro; FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD, Avda. Américo Vespucio, nº 15, 41092 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: FUSTER, Gustavo; Paseo de la Castellana

140, 3ª Planta, Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE FOR PHYSIOLOGICAL EXPRESSION IN T-CELLS

(54) Título: POLINUCLEÓTIDO PARA EXPRESIÓN FISIOLÓGICA EN CÉLULAS T

(57) Abstract: An improved system for generating immunotherapeutic T cells comprising a chimeric antigen receptor (CAR).

(57) Resumen: Sistema mejorado para generar células T inmunoterapéuticas que comprenden un receptor de antígeno quimérico (CAR).



WO 2022/058640 A1

Polinucleótido para expresión fisiológica en células T

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una nueva tecnología para generar células T
5 inmunoterapéuticas. En particular, la invención proporciona un sistema mejorado para
generar células T inmunoterapéuticas que comprenden un receptor de antígeno
quimérico (CAR).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de células T específicas de
10 antígeno autólogo generadas *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar
infecciones virales y cáncer. Las células T utilizadas para la inmunoterapia adoptiva se
pueden generar mediante la expansión de las células T específicas de antígeno o la
redirección de las células T mediante ingeniería genética. La transferencia de células T
específicas de antígenos virales es un procedimiento bien establecido que se utiliza para
15 el tratamiento de infecciones virales asociadas a trasplantes y neoplasias malignas raras
relacionadas con virus. Del mismo modo, se ha demostrado que el aislamiento y la
transferencia de células T específicas de tumor tienen éxito en el tratamiento del
melanoma.

Se han generado con éxito nuevas especificidades en las células T mediante la
20 transferencia genética de receptores de células T transgénicas o receptores de
antígenos quiméricos (CAR). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un
resto de direccionamiento que está asociado con uno o más dominios de señalización
en una sola molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un
dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), que comprende
25 la luz 25 y fragmentos variables de un anticuerpo monoclonal unidos por un conector
flexible. Los restos de unión basados en dominios de receptor o ligando también se han
usado con éxito. Los dominios de señalización para los CAR de primera generación se
derivan de la región citoplasmática de las cadenas gamma del receptor CD3zeta o Fc.
Se ha demostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la
30 citotoxicidad de células T, sin embargo, no lograron proporcionar una expansión
prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Los dominios de señalización de
moléculas coestimuladoras que incluyen CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137) se
han agregado solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación) para
mejorar la supervivencia y aumentar la proliferación de células T modificadas con CAR2.

Los CAR han permitido redirigir con éxito las células T contra los antígenos expresados en la superficie de las células tumorales de diversas neoplasias, incluidos linfomas y tumores sólidos. CD19 se ha presentado como un objetivo atractivo para la inmunoterapia porque la gran mayoría de la leucemia linfoblástica aguda B (ALL-B) 5 expresa de manera uniforme CD19, mientras que la expresión está ausente en las células no hematopoyéticas, así como en las células mieloides, eritroides, T y hueso 10 células madre de médula. Los ensayos clínicos dirigidos a CD19 en tumores malignos de células B están en marcha con respuestas antitumorales alentadoras. La mayoría infunde las células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) con especificidad derivada de la región scFv de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para CD19 FMC63. Sin embargo, todavía existe la necesidad de mejorar la construcción de CAR que muestre una mejor compatibilidad con la proliferación de células T, a fin de permitir que las células que expresan tales CAR alcancen un nivel significativo ventaja clínica. En este sentido y, a pesar del claro 15 beneficio para los pacientes tratados con CAR-T, las tecnologías reales que utilizan 15 promotores fuertes para expresar CAR vienen con un lado negativo. Se han reportado efectos secundarios graves, incluyendo muertes de pacientes. Principalmente debido a un síndrome de liberación de citoquinas (SRC) asociado con la hiperactividad de las células CAR-T en los primeros días después de la infusión. Además, un porcentaje 20 significativo de pacientes que respondieron inicialmente, recayeron como consecuencia de reducir la longevidad (y eficacia) de las células CAR-T administradas. Eyquem, Mansilla-Soto y col. 20 ya han demostrado que la expresión de tipo TCR mejora la actividad antileucémica de las células CAR-T utilizando sistemas de edición del genoma para expresar transgenes a través del promotor del locus TRAC. Sin embargo, las 25 estrategias de edición del genoma utilizan tecnologías muy sofisticadas difíciles de implementar en la práctica clínica.

Por lo tanto, es necesario desarrollar polinucleótidos que imiten el patrón de expresión de TCR de una manera muy precisa, que reduzcan de 3 a 4 veces la expresión del transgén 8-24 h después de la activación de las células T, y que vuelvan a recuperar su 30 expresión a las 48-72 h.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1. LV que expresan eGFP a través de dos promotores B2M sintéticos. A) Se diseñaron dos promotores B2M combinando diferentes regiones reguladoras del locus B2M humano como se muestra en la figura. Se muestran las secuencias completas de 35

ambos promotores sintéticos. Como se puede observar, la principal diferencia entre ambas construcciones es la inserción del potenciador B2M en el 3' (B2M2) o en el 5' (B2M1) del TSS. B) Esquema de los LV que expresan eGFP a través de los promotores sintéticos B2M1 y B2M2. C) Control de LV que expresa eGFP a través del promotor EF1-alfa. LTR: repeticiones terminales largas; eGFP: proteína fluorescente verde mejorada; WPRE: virus de la hepatitis de la marmota (WHP) Elemento regulador postranscripcional.

Fig. 2. La expresión de la proteína CD3 / TCR disminuye en respuesta a estímulos anti-CD3 / CD28 en células T primarias. A) Se aisló una población pura de células T primarias humanas y se estimuló con anti-CD3 / CD28 (TransAct, Miltenyi) a las 0h y se determinó la expresión de CD3 (componente esencial del receptor de células T, TCR) mediante FACS y análisis de ARNm en la indicada veces. B) La expresión de pliegues indicó la relación relativa entre la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD3 en la población de CD3+ en comparación con el MeFI de CD3 en la población de CD3 dividido por esa expresión a las 0 h. Relación relativa = $[\text{CD3MeFI de puerta CD3+} / \text{CD3 MeFI de CD3- puerta en TIME}] / [\text{CD3 MeFI de CD3+ puerta} / \text{CD3 MeFI de CD3- puerta a 0h}]$. C) La expresión de pliegue se refiere a la relación relativa entre el ARNm de CD3 en comparación con el ARNm de GAPDH (utilizado como control interno) dividido a esa expresión a las 0 h. Relación relativa = $[\text{expresión de CD3} / \text{expresión de GAPDH a la HORA}] / [\text{expresión de CD3} / \text{expresión de GAPDH a las 0 h}]$.

Fig. 3. La expresión dirigida por GFP por el promotor quimérico B2M imitó el patrón fisiológico CD3 / TCR después de la activación en contraste con el promotor EF1-alfa. A) Se aislaron y activaron células T primarias humanas para la transducción con los vectores lentivirales (LV) para obtener niveles similares de expresión (~ 30-50%). Las células se dejaron reposar durante 10 días y luego se estimularon con anti-CD3 / CD28 para imitar una estimulación fisiológica del complejo de superficie TCR / CD3. La expresión de CD3 y eGFP se evaluó simultáneamente en los momentos indicados tanto a nivel de proteína (FACS) como de ARNm. (población no transducida) dividida en esa expresión a las 0 h). C) El eje Y izquierdo indica la proporción relativa de ARNm de CD3 y el eje Y derecho se refiere a la proporción relativa de expresión de ARNm de GFP. Relación relativa = $[\text{expresión de GFP} / \text{expresión de GAPDH en el TIEMPO}] / [\text{expresión de GFP} / \text{expresión de GAPDH a las 0 h}]$.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema que permite la expresión de CAR siguiendo el patrón de expresión de TCR, evitando los altos niveles de expresión en la superficie de las células T que se han asociado con una terapia
 5 ineficiente a largo plazo o con efectos secundarios peligrosos que amenazan la vida, como la tormenta de citoquinas. Los autores de la invención han seleccionado LV (lentivirus o lentiviral) como el mejor sistema para lograr una expresión estable y las regiones reguladoras del locus B2M como un buen candidato para expresar los CAR que imitan el patrón de expresión de TCR después de la estimulación de CD3/CD28,
 10 tanto a niveles de proteína como de ARNm.

En base a las regiones reguladoras de B2M, los autores de la invención han creado dos promotores sintéticos que incluyen la mayoría de las regiones reguladoras de locus B2M en un tamaño reducido que nos permite insertarlo en un esqueleto LV.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a un polinucleótido que
 15 comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2, de ahora en adelante polinucleótidos de la invención, o un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia que presente una identidad con la SEQ ID NO: 1 o 2 de al menos:

- a. Un 80%
- b. Un 85%
- 20 c. Un 90%
- d. Un 95%
- e. Un 99%

SEQ ID NO: 1

25 1161 bp

```
aattcggcatgcttatcgatttgctcctcctactgccccttcggcggggagcaggggaggggtctgggggaggcgctg
cccgggaaagcctgtctgctgcagcctaaccagggctttgcgggagcgcagtgctttgctgaattcgtgcattttaac
aaaaacgcctccttctgctgagattctccagagcaaaactggcgcatggccctgtggtctttctgtacacacgcgctt
cctctttgctctttgctggtgtttccaacatgtactgtcctcctactttcggtttgaaaacatgagggggtggcggtgta
30 gcttacgcctgtaatcccagcacttagggaggccgagggcgggaggatggcttgaggcttaggtccgtagtgagaccagcctgg
```


gctgctccggtggctgaggcgggaggatctcttgagcttaggcttttgagcagaaagagaaaagaaaagaaaagaaaag
 aagtgtgaatacaatctcacaaaatctgccgctccctcaatcattttcaataatccaacactttgggaggccaaggca
 ggctgatcactctcaggaactccaaagattcaggtttactcacgtcatccagcagagaatggaagtcaaatttctgaat
 tgctatgtgtcctcactgttctcttacaagaatctgtggactccaccaccgaaatggcggcaccttattatggtcaca
 5 gaatgatgtacctagagggcgtggaagcttaaagccctagcagttactgctttactattagtggtcgtttttctcccc
 cgcccccgacaaatcaacagaaacaaagaaaattacctaaacacttctaacaatcacgagactctaagaaaaggaa
 actgaaaacgggaaagtcctctcttaacctggcactgctgctgctggagacaggagacggcctcctgcgggcct
 tgcctgattggctggccgcttaataataagtggaggcgtcgctggcgggcatcctgaagctgacagcattcgggc
 cgagtgtctcgtccgtggccttagctgtgctcgctactctcttctggcctggaggctatccagcagagactctcta
 10 ccctcccgtggcgcgcccgg

En concreto, el polinucleótido de la invención de SEQ ID NO 1, también llamado B2M_EWP1, es una secuencia de 1161 nucleótidos que contiene fragmentos de B2 microglobulina (B2M).

SEQ ID NO: 2

15 >B2M_EWP2 1264 bp

gaattcggcatgcttatcgattctcactgttctcttagaaaagatctgtggactccaccaccagaaatggcggcaccttat
 ttatggtcacacaatgatgtacctagagggcgtggaagcttaaagccctagcagttactgctttactattagtggtcgttt
 tttctccccccgcccccgacaaatcaacagaaacaaagaaaattacctaaacacttctaacaatcacgagactctaa
 gaaaaggaaactgaaaacgggaaagtcctctcttaacctggcactgctgctgctggagacaggagacggcctc
 20 ctgcgggccttgctcctgattggctgggctcgctgcttaataataagtggaggcgtcgctggcgggcatcctgaagcttcct
 atcagtgatagagatccctatcagtgatagagagacagcattcgggcccagtgctcgtcctggccttagctgtgct
 gcgctactctcttctggcctggaggctatccagcgtgagtctctctaccctcccgtctggtcctccttactgccccttc
 ggcggggagcaggggaggggtctgggggaggcgtcgcccggaaagcctgtctgctgagcctaaccagggcctttg
 cgggagcgcattgcttttgctgtaattcgtgcatttttttaagaaaaacgcctgccttctcgtgagattcctcagagcaa
 25 actggcgcatggccctgtggtctttctgacacacggctcctctttggctctttgctggtgtttccaagatgtactgtc
 ctcttactttcggtttgaaaacatgagggggtggcgctggtagcttacgcctgtaatcccagcacttagggaggccgag
 cgggaggatgcttgaggcctgagtgagaccagcctgggctgctccggtggctgaggcgggaggatctctgagctta
 ggcttttgagcagaaagagaaaagaaaagaaaagaagtgtgaatacaatctcacaaaatctgccgctccctc
 aatcattttcaataatccaacactttgggaggccaaggcaggctgatcactctcaggaactccaaagattcaggttactc
 30 acgtcatccagcagagaatgaaagtaaaatttctgtgcttttctgacagaggcctcgaattgctatgtgtctgtggtctt
 ttcgtacacaggccttcggcgcgcccgggatcc

En concreto, el polinucleótido de la invención de SEQ ID NO 2, también llamado B2M_EWP2, es una secuencia de 1264 nucleótidos que contiene fragmentos de B2 microglobulina (B2M).

Cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) se incluyen preferiblemente en vectores lentivirales con la finalidad de poder expresarlos de forma estable en las células.

- 5 Para dirigir el polipéptido transmembrana hacia la vía secretora de una célula huésped, una secuencia señal (también conocida como secuencia líder, prepro secuencia o presecuencia) puede ser proporcionada en la secuencia de cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) o en la secuencia de un vector, tal y como un vector lentiviral, que comprenda dichos polinucleótidos. La
- 10 secuencia señal secretora estará operativamente ligada a la secuencia de ácido nucleico transmembrana, es decir, las dos secuencias se unen en el marco de lectura correcto y se colocan para dirigir el nuevo polipéptido sintetizado en la vía secretora de la célula huésped. Las secuencias señal secretoras se colocan comúnmente en 5' con respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés, aunque
- 15 ciertas secuencias señal secretoras pueden colocarse en cualquier otra parte de la secuencia de ácido nucleico de interés (véase, por ejemplo, Welch et al., Patente de EE.UU. 5,037,743; Holland et al., Patente de Estados Unidos N° 5.143.830). Los expertos en la técnica reconocerán que, en vista de la degeneración del código genético, una considerable variación de secuencia es posible entre estas moléculas de
- 20 polinucleótidos. Preferiblemente, las secuencias de cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) podrán comprender codones optimizados para la expresión en células de mamífero, preferiblemente para expresión en células humanas. La optimización de codones se refiere al intercambio en una secuencia de interés de codones que son generalmente raros en genes altamente expresados de una
- 25 especie dada por codones que son generalmente frecuentes en genes altamente expresados de tales especies, tales codones codificando los aminoácidos como los codones que se intercambian.

- Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a una construcción genética, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende cualquiera de los
- 30 polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2). Preferiblemente, la construcción genética de la invención es un vector viral, y más preferiblemente un vector lentiviral. Más preferiblemente, la construcción genética de la invención comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) operativamente unidos a la secuencia de un CAR para impulsar su expresión, donde el

CAR, comprenderá al menos un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular.

CÉLULAS DE LA INVENCION

- 5 Otro **aspecto** de la invención se refiere a una célula, de ahora en adelante célula de la invención, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), o la construcción genética de la invención que a su vez comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2). En una realización preferida de este aspecto, la célula de la invención es una célula inmune.
- 10 Más preferiblemente, se prefieren poblaciones de células de la invención.

En una realización particular, la invención se refiere a un método de preparación de células inmunes para inmunoterapia que comprenden la introducción en dichas células inmunitarias de cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), o de la construcción genética o vector según la presente invención, y expandir

15 dichas células. En una realización particular, la invención se refiere a un método que comprende proporcionar una célula y expresar en la superficie de dicha célula al menos un CAR. En una realización particular, el método comprende transformar o transducir la célula con al menos cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) o con un vector o construcción génica que comprende cualquiera de los

20 polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) operativamente unidos a la secuencia de un CAR, y expresar dichos polinucleótidos en dicha célula. Es decir, preferiblemente para la transformación o transducción celular se clona cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2) en un vector que comprenda el CAR de interés.

- 25 En otra realización, dicho método comprende además una etapa de modificar genéticamente dicha célula inactivando al menos un gen que expresa un componente del TCR, una diana para un agente inmunosupresor, el gen HLA y/o un gen de punto de control inmunológico como PD1 o CTLA-4. En una realización preferida, dicho gen se selecciona del grupo que consiste en TCRalpha, TCRbeta, CD52, GR, PD1 y CTLA-4.
- 30 En una realización preferida dicho método comprende, además, introducir en dichas células T una endonucleasa de corte raro capaz de inactivar selectivamente mediante la escisión del ADN dichos genes. En una realización más preferida, dicha endonucleasa de corte raro TALE-nucleasa o endonucleasa Cas9.

Los diferentes métodos descritos anteriormente preferiblemente implican la introducción de CAR en una célula utilizando vectores de expresión que comprendan o que presenten clonados los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2). Como ejemplo no limitativo, dicho CAR puede introducirse como transgenes codificado por un vector lentiviral.

Células inmunes

La presente invención también se refiere a células o líneas celulares aisladas susceptibles de ser obtenidas por dicho método para diseñar células. En particular, dicha célula aislada comprende al menos un CAR y un promotor de B2 microglobulina, preferiblemente cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), en particular de SEQ ID NO 1 o 2, operativamente unidos al CAR para impulsar su expresión. En otra realización, dicha célula aislada comprende una población de CAR y promotores del locus B2 microglobulina, en particular de SEQ ID NO 1 o 2, operativamente enlazada a los CAR para impulsar su expresión, cada uno comprende diferentes dominios de unión a ligando extracelular. Células inmunes de la presente invención se activan y proliferan independientemente de los mecanismos de unión del antígeno.

En el alcance de la presente invención también se incluye una célula inmunitaria aislada, preferiblemente una célula T obtenida según cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Dicha célula inmune se refiere a una célula de origen hematopoyético involucrada funcionalmente en la iniciación y/o ejecución de una respuesta inmune innata y/o adaptativa. Dicha célula inmune según la presente invención puede derivarse de una célula madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias no humanas, más particularmente células madre no humanas, células madre de cordón umbilical, células progenitoras, células madre de la médula ósea, células madre pluripotentes inducidas, células madre totipotentes o células madre hematopoyéticas. Las células humanas representativas son células CD34 +. Dicha célula aislada también puede ser una célula dendrítica, una célula dendrítica asesina, un mastocito, una célula NK, una célula B o célula T. En una realización preferida es una célula T seleccionada del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T auxiliares. En otra realización, dicha célula puede derivar del grupo que consiste en linfocitos T CD4 + y linfocitos T CD8 +. Antes de la expansión y modificación genética de las células de la invención, se puede obtener una fuente de células de un sujeto a través de una variedad de métodos. Las células se pueden obtener de una serie de fuentes no limitantes, incluidas las células

mononucleares de sangre periféricas, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En ciertas realizaciones de la presente invención, se pueden emplear cualquier número de líneas de células T disponibles y conocidas por los expertos en la técnica. En otra realización, dicha célula se puede derivar de un donante sano, de un paciente con diagnóstico de cáncer o de un paciente con diagnóstico de infección. En otra realización, dicha célula forma parte de una población mixta de células que presentan diferentes características fenotípicas. El alcance de la presente invención también abarca una línea celular obtenida de una célula T transformada de acuerdo con el método descrito previamente. Células modificadas resistentes a un tratamiento inmunosupresor y susceptibles de ser obtenidas por el método anterior se engloban en el alcance de la presente invención.

Activación y expansión de células T

Ya sea antes o después de la generación de las células T transformadas o transducidas, incluso si las células inmunes modificadas de la presente invención se activan y proliferan independientemente de los mecanismos de unión al antígeno, las células inmunes, en particular las células T de la presente invención se pueden activar y expandir adicionalmente generalmente usando métodos como el descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 6.352.694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7.067.318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. núm. 20060121005. Las células T pueden expandirse *in vitro* o *in vivo*. Generalmente, las células T de la invención se expanden por contacto con un agente que estimula un complejo CD3/TCR y una molécula coestimuladora en la superficie de las células T para crear una señal de activación para las células T. Por ejemplo, productos químicos como el ionóforo de calcio A23187, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), o lectinas mitogénicas como fitohemaglutinina (PHA) se pueden utilizar para crear una señal de activación para la célula T.

Como ejemplos no limitantes, las poblaciones de células T pueden estimularse *in vitro*, por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la co-estimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en

- condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Medios Esenciales Mínimos o Medio RPMI1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido el suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGF y TNF- o cualquier otro aditivo para el crecimiento de las células. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocinas suficiente para el crecimiento y expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 ° C) y atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de CO₂). Células T que han sido expuestas a diversos tiempos de estimulación pueden presentar diferentes características.
- En otra realización particular, dichas células pueden expandirse mediante co-cultivo con tejido o células. Dichas células también pueden expandirse *in vivo*, por ejemplo, en la sangre del sujeto después de administrar dicha célula en el sujeto.

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

- Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), la construcción genética de la invención que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), o la célula de la invención. En una realización preferida, la composición de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica. En otra realización preferida, la composición de la invención comprende uno o más principios activos adicionales.

USOS MÉDICOS DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), la construcción genética de la invención, la célula de la invención, o la composición de la invención, para su uso en terapia.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2), la construcción genética de la invención, la célula de la invención, o la composición de la invención, para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en neoplasias, neoplasias de células B, linfoma, leucemia y/o mieloma.

10 Las células aisladas obtenidas por los diferentes métodos o la línea celular derivada de dicha célula aislada como se describió previamente, pueden usarse como un medicamento. En otra realización, dicho medicamento se puede utilizar para tratar el cáncer, particularmente para el tratamiento de linfomas de células B y leucemia en un paciente que lo necesite. En otra realización, dicha célula aislada según la invención o
15 línea celular derivada de dicha célula aislada se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un paciente que lo necesita.

En otro aspecto, la presente invención se basa en métodos para tratar a pacientes que necesitan del mismo, comprendiendo dicho método al menos uno de los siguientes pasos:

(a) proporcionar cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ
20 ID NO 2), la construcción genética de la invención, la célula de la invención, o la composición de la invención, y preferiblemente una célula inmunitaria obtenible mediante cualquiera de los métodos anteriormente descritos;

(b) Administrar cualquiera de los polinucleótidos de la invención (SEQ ID NO 1 o SEQ
25 ID NO 2), la construcción genética de la invención, la célula de la invención, o la composición de la invención, o más preferiblemente células inmunes transformadas, a dicho paciente.

En una realización, dichas células T de la invención pueden experimentar una expansión sólida de células T *in vivo* y pueden persistir durante un período de tiempo prolongado.

30 Dicho tratamiento puede ser paliativo, curativo o profiláctico. Puede ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte de un tratamiento de inmunoterapia alogénica. Por autólogas, significa que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para tratar pacientes son procedente de dicho paciente. Por alogénico se entiende que

las células o población de células utilizadas para el tratamiento de pacientes no se originan en dicho paciente, sino en un donante.

Las células que se pueden usar con los métodos descritos se describen en la sección anterior. El tratamiento se puede utilizar para tratar a pacientes diagnosticados con
5 cáncer. Los cánceres que pueden tratarse pueden comprender tumores no sólidos (como tumores hematológicos, que incluyen, entre otros, LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA del adulto, linfoma de células del manto, células B grandes difusas linfoma y similares). Tipos de cánceres a tratar con los CAR de la invención incluyen, pero no se limitan a, ciertas leucemias o neoplasias linfoides. También se incluyen
10 tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres pediátricos. Puede ser un tratamiento en combinación con una o más terapias contra el cáncer seleccionadas del grupo de terapia de anticuerpos, quimioterapia, terapia de citocinas, terapia de células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, terapia con luz láser y radioterapia.

Según una realización preferida de la invención, dicho tratamiento puede administrarse
15 en pacientes sometidos a un tratamiento inmunosupresor. De hecho, la presente invención preferiblemente se basa en células o población de células, que se han hecho resistentes al menos a un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen que codifica un receptor para tal agente inmunosupresor. En este aspecto, el tratamiento inmunosupresor debe ayudar a la selección y expansión de las células T según la
20 invención dentro del paciente.

La administración de células o población de células según la presente invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluso mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones
25 descritas en este documento puede administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, por vía intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o intraperitonealmente. En una realización, las composiciones celulares de la presente invención son preferiblemente administrado por inyección intravenosa.

La administración de las células o población de células puede consistir en la
30 administración de 10^4 - 10^9 células por kg de peso corporal, preferiblemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los números enteros valores de números de celda dentro de esos rangos. Las células o población de células pueden ser administradas en una o más dosis. En otra realización, dicha cantidad efectiva de células se administran como dosis única. En otra realización, dicha cantidad efectiva de células
35 se administran como más de una dosis durante un período de tiempo. El momento de

la administración es dentro del juicio del médico responsable y depende de la condición clínica del paciente. Las células o la población de células se pueden obtener de cualquier fuente, como sangre, bancos o un donante, incluyendo el propio paciente. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de los rangos óptimos de cantidades eficaces de un tipo de célula dado para una enfermedad o afecciones particulares, se encuentra dentro del conocimiento de la técnica.

Una cantidad eficaz o efectiva significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

La dosis administrada dependerá de la edad, salud y peso del paciente destinatario, tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, frecuencia del tratamiento y naturaleza del efecto deseado. En otra realización, dicha cantidad efectiva de células o composición que comprenden esas células se administran por vía parenteral. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las células se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) cualquier número de modalidades de tratamiento, que incluyen, entre otros, el tratamiento con agentes como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o natalizimab, tratamiento para pacientes con EM o tratamiento con efalizimab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP.

En otras realizaciones, las células T de la invención pueden ser utilizado en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micoplienólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente del calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhibir la quinasa p70S6 que es importante para el crecimiento señalización inducida por factores (rapamicina) (Henderson, Naya et al. 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander y col. 1993). En

una realización adicional, las composiciones de células de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o a continuación de) un trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T usando quimioterapia agentes como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otra forma de realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una

terapia ablativa de células B, como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunes expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

Otras definiciones

- A menos que se especifique lo contrario, "un", "uno", "el," y "al menos uno" se utilizan indistintamente y significa uno o más de uno.

- Los residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica son designado aquí según el código de una letra, en el que, por ejemplo, Q significa Gln o residuo de glutamina, R significa Arg o residuo de arginina y D significa Asp o residuo de ácido aspártico.

- Sustitución de aminoácidos significa la sustitución de un residuo de aminoácido por otro, por ejemplo, el reemplazo de un residuo de arginina con un residuo de glutamina en la secuencia de un péptido es una sustitución de aminoácidos.

- Los nucleótidos se designan como sigue: se utiliza el código de una letra para designar la base de un nucleósido: a es adenina, t es timina, c es citosina y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g ó a (nucleótidos de purina), k representa g ó t, s representa g ó c, w representa a ó t, m representa a ó c, y representa t ó c (nucleótidos de pirimidina), d representa g, a ó t, v representa g, a ó c, b representa g, t ó c, h representa a, t ó c, yn representa g, a, t ó c.

"Como se usa en este documento," ácido nucleico "o" polinucleótidos "se refiere a nucleótidos y/o polinucleótidos, como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados por ligación, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos que se encuentran en la naturaleza (como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos naturales (p. ej., formas enantioméricas de nucleótidos naturales) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en los restos de azúcar y/o en la base de pirimidina o purina. Las modificaciones del azúcar incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o azúcares pueden ser

funcionalizados como éteres o ésteres. Además, toda la fracción de azúcar se puede reemplazar con estructuras estérica y electrónicamente similares, como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas alquiladas y pirimidinas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico se pueden unir mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

- Por receptor de antígeno quimérico (CAR) se entiende moléculas que combinan un dominio de unión contra un componente presente en la célula diana, por ejemplo, una especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un receptor de células T que activa el receptor intracelular dominio para generar una proteína quimérica que exhibe una inmunidad celular específica anti-target. Generalmente, CAR consiste en un anticuerpo extracelular monocatenario (scFv) fusionado al dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo del receptor de antígeno de células T (scFv) y tienen la capacidad, cuando se expresan en células T, de redirigir el reconocimiento de antígenos en función de la especificidad del anticuerpo monoclonal.

- Por "vector de entrega" o "vectores de entrega" se entiende cualquier vector de entrega que pueda ser utilizado en la presente invención para poner en contacto celular (es decir, "contactar") o liberar dentro de las células o compartimentos subcelulares (es decir, "introducir") agentes/sustancias químicas y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios en la presente invención. Incluye, pero no se limita a, vectores liposomales de liberación, vectores de liberación viral, vectores de liberación de fármacos, portadores químicos, portadores poliméricos, lipoplexes, polyplexes, dendrímeros, microburbujas (agentes de contraste de ultrasonido), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de liberación permiten el suministro de moléculas, productos químicos, macromoléculas (genes, proteínas) u otros vectores como plásmidos, péptidos. En estos casos, los vectores de administración son portadores de moléculas. Por "vector de liberación" o "vectores de liberación" también se entiende los métodos de liberación destinados a realizar la transfección.

- Los términos "vector" o "vectores" se refieren a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un "vector" en la presente invención incluye, pero no se limita a, un vector viral, un plásmido, un vector de ARN o una molécula lineal o circular de ADN o ARN que puede constar de una molécula

cromosómica, no cromosómica, semisintética o ácidos nucleicos sintéticos. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episomal) y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados (vectores de expresión). Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y comercialmente disponibles.

Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (p. Ej. Virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa como ortomixovirus (p. ej., virus de la influenza), rabdovirus (p. Ej., Rabia y virus de la estomatitis vesicular), paramixovirus (p. Ej. Sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva como picornavirus y alfavirus, y Virus de ADN de doble cadena que incluyen adenovirus, herpesvirus (p. Ej., Virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (p. ej., vaccinia, viruela aviar y canarypox). Otros virus incluyen virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus de tipo C de mamíferos, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLVBLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: Los virus y sus replicación*, In *Fundamental Virology*, Tercera Edición, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996).

- Por "vector lentiviral" se entiende vectores lentivirales basados en el VIH que son muy prometedores para liberación debido a su capacidad de envasado relativamente grande, inmunogenicidad reducida y su capacidad para transducir de manera estable con alta eficiencia una amplia gama de diferentes tipos de células. Los vectores lentivirales generalmente se generan después de la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, envoltente y transferencia) o más plásmidos en células productoras. Como el VIH, los vectores lentivirales entran en la célula diana a través de la interacción de glicoproteínas de superficie viral con receptores en la superficie celular. Al entrar, el ARN viral se somete a una transcripción inversa, que está mediada por el complejo viral de transcriptasa inversa. El producto de la transcripción inversa es una doble hebra de ADN viral lineal, que es el sustrato para la integración viral en el ADN de células infectadas. Por "vectores lentivirales integradores (o LV)", se entiende vectores tales como por ejemplo, pero sin limitarse, aquellos que son capaces de integrar el genoma de una célula diana. Por el contrario, como "vectores lentivirales no integrativos (o NILV)" se refiere a vectores de suministro de genes eficientes que no se integran el genoma de una célula diana mediante la acción del virus integrasa.

- Los vectores y vectores de liberación se pueden asociar o combinar con cualquier técnica de permeabilización celular, como sonoporación o electroporación o derivados de estas técnicas.

5 - Por célula o células se entiende cualquier célula viva eucariota, célula primaria y línea celular derivados de estos organismos para cultivos *in vitro*.

- Por "célula primaria" o "células primarias" se entiende las células extraídas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecidas para crecimiento *in vitro*, que han sufrido muy pocas duplicaciones de población y, por lo tanto, son más representativas de los principales componentes y características de los tejidos de los que se derivan, en comparación a líneas celulares tumorigénicas continuas o inmortalizadas artificialmente.

10

Como ejemplos no limitantes, se pueden seleccionar líneas celulares del grupo que consiste en células CHO-K1; Células HEK293; Células Caco2; Células U2-OS; Células NIH 3T3; Células NSO; Células SP2; Células CHO-S; Células DG44; Células K-562, células U-937; Células MRC5; Células IMR90; Células Jurkat; Células HepG2; Células HeLa; Células HT-1080; Células HCT-116; Células Hu-h7; Células Huvec; Células Muda

15 4.

Todas estas líneas celulares pueden modificarse mediante el método de la presente invención para proporcionar modelos de línea celular para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también se pueden utilizar para seleccionar moléculas biológicamente activas de interés en la investigación y producción y diversos campos como químico, biocombustibles, terapéutica y agronomía, como ejemplos no limitativos.

20

- por "mutación" se entiende la sustitución, supresión, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más nucleótidos/ aminoácidos en un polinucleótido (cDNA, gen) o una secuencia polipeptídica. La mutación puede afectar la secuencia codificante de un gen o su secuencia reguladora. También puede afectar la estructura de la secuencia genómica o la estructura / estabilidad del ARNm codificado.

25

- por "variante (s)", se entiende una variante repetida, una variante, una variante de unión al ADN, una variante TALE nucleasa, una variante polipeptídica obtenida por mutación o reemplazo de al menos un residuo en la secuencia de aminoácidos de la molécula madre.

30

- por "variante funcional" se entiende un mutante catalíticamente activo de una proteína o dominio de una proteína; dicho mutante puede tener la misma actividad en comparación con su proteína o dominio de proteína original o propiedades adicionales, o mayor o menor actividad.

- 5 - "identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. La identidad se puede determinar mediante la comparación de una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre
- 10 secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico. Se pueden usar varios algoritmos de alineación y/ o programas para calcular la identidad entre dos secuencias, incluyendo FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de
- 15 Wisconsin, Madison, Wis.) Y se puede utilizar con, por ejemplo, la configuración predeterminada. Por ejemplo, polipéptidos que tienen al menos 70%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con los polipéptidos descritos en este documento y que preferiblemente exhiben sustancialmente las mismas funciones, así como el polinucleótido que codifica dichos polipéptidos, se contemplan.
- 20 - "similitud" describe la relación entre las secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos. BLASTP también puede usarse para identificar una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 87,5%, 90%, 92,5%, 95%, 97,5%, 98%, 99% de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia utilizando una matriz de similitud como BLOSUM45, BLOSUM62 o
- 25 BLOSUM80. A menos que se indique lo contrario, una puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se utiliza BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación de BLASTP positivos y el porcentaje de identidad de secuencia se basa en la puntuación de identidades BLASTP. "Identidades" de BLASTP muestra el número y fracción de residuos totales en los pares de secuencias de alta puntuación que son
- 30 idénticos; y "Positivos" BLASTP muestra el número y la fracción de residuos para los que las puntuaciones de alineación tienen valores positivos y son similares entre sí. Secuencias de aminoácidos que tienen estos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad o de similitud con las secuencias de aminoácidos descritas en este documento, se contemplan y están abarcadas por esta divulgación.
- 35 Las secuencias de polinucleótidos de polipéptidos similares son deducidos utilizando el código genético y pueden obtenerse por medios convencionales. El polinucleótido que

codifica una variante funcional de este tipo se produciría mediante traducción inversa de su secuencia de aminoácidos utilizando el código genético.

- "dominio transductor de señal" o "ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígenos que se une específicamente a una molécula coestimuladora análoga en una célula T, que proporciona una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, mediante la vinculación de un complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con péptido, media una respuesta de célula T, incluyendo, pero sin limitarse a, activación de proliferación, diferenciación y similares. El ligando coestimulador puede incluir, entre otros, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en una célula T, tales como, pero no limitado a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, linfocitos antígeno 1 asociado a la función (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en una célula T que específicamente se une a un ligando coestimulador, mediando así una respuesta coestimuladora de la célula, tales como, pero no limitado a la proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan, a una molécula de MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando de Toll.

Una "señal coestimuladora" como se usa en este documento se refiere a una señal, que en combinación con la señal primaria, como la ligadura de TCR / CD3, conduce a la proliferación de células T y/o regulación positiva o regulación a la baja de moléculas clave.

-El término "dominio de unión a ligando extracelular" como se usa en el presente documento se define como un oligo o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando. Preferiblemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede ser elegido para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad particular. Así ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen los asociados con virus, bacterias e infecciones parasitarias, enfermedades autoinmunes y células cancerosas.

El término "sujeto" o "paciente" como se usa en este documento incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos primates no humanos y humanos.

La descripción anterior de la invención permite que cualquier persona experta en esta técnica pueda hacer y usar la invención, en particular para el objeto de las reivindicaciones adjuntas, que forman parte de la descripción original.

Cuando se indica aquí un límite o rango numérico, se incluyen los puntos finales. Además, todos los valores y los subintervalos dentro de un límite o rango numérico se incluyen específicamente como si se hubieran escrito específicamente.

Varias modificaciones a las realizaciones preferidas serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y los principios genéricos definidos en este documento se pueden aplicar a otras realizaciones y aplicaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, esta invención no está destinada a limitarse a las realizaciones mostradas, sino que debe concederse el alcance más amplio de acuerdo con los principios y características aquí descritos.

Habiendo descrito en general esta invención, se puede obtener una mayor comprensión mediante referencia a ciertos ejemplos específicos, que se proporcionan en este documento con fines ilustrativos únicamente, y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario.

A menos que se defina específicamente en este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado como comúnmente lo entiende un experto en los campos de la terapia génica, bioquímica, genética y biología molecular. Todos los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención, con métodos y materiales adecuados que se describen en este documento. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas aquí son incorporadas por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no son pretende ser limitante, a menos que se especifique lo contrario. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular

- Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds. -in-chief, Academic Press, Inc., New York), específicamente, Vols.154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

EJEMPLOS DE LA INVENCION

ESQUEMA

- 20 **1. Generación *in silico* de promotores quiméricos de las diferentes moléculas implicadas en la ruta de señalización del TCR.**
- a. Selección de las moléculas implicadas en la ruta de señalización del TCR.
 - b. Búsqueda en bases de datos de elementos reguladores implicados en la expresión y función promotora de las moléculas seleccionadas.
- 25 c. Diseño de las construcciones definitivas *in silico*.
- 2. Generación de células T eGFP+, donde eGFP se exprese bajo el control de los diferentes promotores quiméricos.**
- a. Clonaje de las secuencias promotoras en un vector lentiviral con GFP.
 - b. Producción de vectores lentivirales con las diferentes construcciones.

c. Transducción celular con los vectores virales, y estudio de la cinética de expresión de GFP, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína.

3. Generación de células T-CAR-CD19, dónde el CAR se exprese bajo el control de los diferentes promotores quiméricos.

a. Clonaje de las secuencias promotoras en un esqueleto lentiviral que contenga el CAR.

b. Producción de vectores lentivirales con las diferentes construcciones.

c. Transducción celular con los vectores virales, y estudio de la cinética de expresión del CAR, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína.

10

Materiales y métodos

1. Diseño de los promotores quiméricos

Se ha generado una construcción (B2M) que contiene un promotor definido por Genecopoeia (chr15:45002449-45003706). También se añadió un promotor definido por EPD (chr15:45003666-45003725) aguas abajo, y el promotor 3 definido por Switchgear. Estos dos últimos solapan parcialmente con el exón 1 de la B2M. Aguas abajo se ha colocado una región definida por Ensembl como *enhancer* (chr15:45004699-45004998), y en la región 3', otro promotor definido por Switchgear que solapa con el exón 2. La construcción B2M TetO es idéntica, pero colocando la secuencia TetO aguas abajo del TSS, mientras que en la construcción B2M Enh5', cambiamos la posición del enhancer definida por Ensembl de la región 3' a la 5'

2. Clonaje molecular de los vectores

Las construcciones se reconstituyeron en 20 µL de agua de agua ultrapura en condiciones de esterilidad.

a. Plásmido SEWP con los promotores quiméricos

SEWP es un plásmido que permite la expresión de eGFP bajo el control del promotor viral SFFV (del inglés spleen focus-forming virus). Se modificó este plásmido (disponible en el laboratorio) para sustituir el promotor por las construcciones quiméricas. Se realizaron las digestiones combinadas de todas las construcciones con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (*New England Biolabs*) usando el buffer 2.1 (*New England*

30

Biolabs) durante 1 hora y media a 37°C. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa ultrapura, y se aislaron las bandas mediante el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Paralelamente, se digirió el esqueleto SEWP con las mismas enzimas para obtener el fragmento sin promotor. Se realizó la ligación de los promotores con los fragmentos de SEWP utilizando la DNA ligasa T4 (*New England Biolabs*) en una proporción inserto:vector de 7:1. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 16°C. Se transformaron bacterias competentes *E. coli* Stbl3 (Life Technologies) con el producto de ligación, y se comprobaron las colonias positivas por PCR de colonias, con el siguiente programa: 1x (95°C, 10 min); 35x (95°C, 30 seg / 62°C, 30 seg / 72°C, 30 seg); 1x (72°C, 10 min), mediante el kit KAPA Taq PCR (Kapa Biosystems) y los siguientes cebadores (Sigma): Fw-cPPT (5'-ACAGCAGAGATCCAGTTTGG-3') y Rv-eGFP (5'-TCACTCTCGGCATGGACG-3') (Fig. 5). Se realizó una miniprep usando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de las colonias positivas para la ligación, y el ADN plasmídico se chequeó por patrón de HindIII y por secuenciación.

b. CAR 3G con los promotores quiméricos

Para generar los plásmidos de interés, se partió de un CAR de tercera generación frente a CD19 (Creative Biolabs) que presenta el promotor EF1- α (factor de elongación 1 α , del inglés *Elongation Factor 1 α*). Se clonaron 4 construcciones: CD247, LCK, B2M y CD4 P1 en el esqueleto lentiviral del CAR. Para ello, se realizaron las digestiones con las enzimas ClaI y EcoRI y el buffer 3.1 (*New England Biolabs*) en el plásmido original del CAR para liberar el promotor, y en las construcciones en pUC57 para obtener los promotores quiméricos, a 37°C durante 1 hora y media. Se aislaron las bandas de un gel de agarosa ultrapura y se realizó la ligación de igual manera. Se transformaron bacterias competentes y se volvió a chequear colonias positivas por PCR de colonias, con los cebadores Fw cPPT-clínico (5'-GTGCAGGGGAAAGAATAGTAG-3') y Rv CD19 (5'-TACAGGACTTTCTTTCTGCC-3'). Se realizaron minipreps de las colonias positivas con el mismo kit, y se chequearon por patrón HindIII y por secuenciación.

30 3. Cultivo celular

a. Cultivo de líneas celulares

Se realizó el cultivo de 4 líneas celulares. La línea celular utilizada para la producción de vectores lentivirales fue la HEK-293T (células embrionarias procedentes de riñón humano, ATCC® CRL-11268™). Son células adherentes que se cultivaron en frascos

T175 con medio DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco, del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biowest) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/S; 0,5% de cada uno) (Biowest). La línea BxPC-3 (células de adenocarcinoma pancreático humano, ATCC® CRL-1687™) es también una línea celular adherente que se cultivó en frascos T25 con medio RPMI-1640 (del inglés Roswell Park Memorial Institute) (Biowest) suplementado con un 10% de FBS y un 1% de P/S. Las líneas Jurkat (de leucemia de células T aguda, ATCC® TIB-152™) y Namalwa (de linfoma de Burkitt, ATCC® CRL-1432™) son células en suspensión que se cultivan también con medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de FBS y un 1% de P/S, ambas cultivadas en frascos T25.

Las cuatro líneas celulares se mantuvieron en incubadores con una temperatura de 37°C. Las HEK-293T se mantuvieron en una atmósfera al 10% de dióxido de carbono (CO₂), mientras

que las 3 líneas restantes se mantuvieron con una atmósfera al 5% de CO₂. Las células fueron pasadas 3 veces por semana, manteniendo una densidad celular aproximada de 1*10⁶ células/mL.

b. Cultivo de células T primarias

Las células T primarias se obtuvieron a partir sangre periférica movilizada de un donante sano. Partiendo de la sangre periférica, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells) por centrifugación por gradiente de densidad, utilizando para ello Lymphosep (Biowest), un medio específico para separar linfocitos. La centrifugación se llevó a cabo con una duración de 30 minutos a 400g sin freno ni aceleración. Se realizaron sucesivos lavados, y se aislaron los linfocitos T de todo el cóctel celular usando el kit MACSxpress® Pan T Cell Isolation (Miltenyi Biotec), que consta de una mezcla de anticuerpos frente a la mayoría de marcadores de superficie de PBMCs a excepción de CD3, conjugados con microesferas magnéticas, por lo que constituye un método de separación magnética basado en la depleción negativa de todos los tipos celulares a excepción de las células T (CD3+). Las células T aisladas se cultivaron con medio TexMACSTM (Miltenyi Biotec), un medio específico de células T, suplementado con un 5% de suero humano AB (Biowest), un 1% de P/S y 20 UI/mL de interleuquina-2 (IL-2) (Miltenyi Biotec), mantenidas en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Para favorecer el crecimiento celular, estas se estimularon vía TCR con T Cell TransAct™ (Miltenyi Biotec), una nanomatriz polimérica anti-CD3/anti-CD28. Las células se pasaron entre 2 y 3 veces por semana, manteniendo una densidad celular de 1*10⁶ células/mL.

4. Producción de vectores lentivirales

La producción de vectores se realizó utilizando las células HEK-293T como células
5 empaquetadoras. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (*Life Sciences*)
presentando una confluencia mayor del 90%.

a. Transfección

Se utilizó un sistema de empaquetamiento de segunda generación, lo que implica la
utilización de 3 plásmidos derivados del genoma lentiviral: 1) Plásmido de transferencia
10 (B2M-SEWP y B2M-CAR); 2) Plásmido empaquetador (pCMV8.9) del virus del VIH, y 3)
Plásmido de envuelta (pMD2.G) VSV-G, que presenta el mayor rango de infectividad.
Se mantuvo entre ellos la proporción 10:7:3 respectivamente. El agente transfectante
elegido fue la LipoD293TM (SigmaGen Laboratories). La transfección se realizó en
DMEM sin suero y, 5 horas post-transfección, se realizó un cambio de medio con
15 Optimen (Gibco) para eliminar la toxicidad a largo plazo de VSV-G y facilitar la posterior
concentración.

b. Recogida del sobrenadante viral y concentración

Se realizaron 3 recogidas, la primera se realizó 24 horas después de la transfección, la
segunda 48 horas después y la tercera, 72 horas después. Las partículas virales
20 presentes en el sobrenadante se recogieron utilizando jeringas estériles de 5 mL
(Terumo), y se filtró utilizando filtros con un tamaño de poro de 0,45 µm (*Life Sciences*).
La concentración de las partículas virales se llevó a cabo utilizando filtros Amicon Ultra
– 15 de 100 kD (Milipore), mediante centrifugación a 1800g a 4°C. Los vectores se
almacenaron a -80°C.

25 c. Titulación

La titulación de los vectores (unidades de transducción/mililitro; UT/mL) se realizó por
cálculo de partículas eficientes mediante citometría de flujo (FACS Canto II, BD
Biosciences).

5. Transducción celular

30 En el caso de los vectores GFP, realizó la transducción de 5 tipos celulares: Jurkat,
Namalwa, HEK-293T, BxPC-3 y células T primarias. Respecto a las células Jurkat y

Namalwa, se plaquearon 100.000 células por pocillo, en placas de 48 pocillos y se añadieron los vectores virales. Para mejorar la eficacia de transducción, las células se espinocularon. La espinoculación es un proceso de centrifugación a 800g, 32°C durante 1 hora para favorecer el contacto célula – vector. En el caso de las células 293T, se

5 plaquearon también 100.000 células. Respecto a las células BxPC-3, se plaquearon 50.000 células por pocillo una placa de 24 pocillos. Finalmente, en el caso de las células T, se plaquearon 200.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y, previo a la transducción, se activaron vía TCR utilizando T Cell TransAct™ durante 24h. La transducción se realizó mediante espinoculación. En todos los casos, 5 horas post -

10 transducción se realizó un cambio de medio y, 3 días después, se determinó el porcentaje de células transducidas mediante citometría de flujo.

En el caso de los vectores CAR, la transducción se llevó a cabo en células Jurkat y en células T primarias, siguiendo el mismo procedimiento.

6. RT-PCR

15 Para realizar esta técnica, se partió de aproximadamente 700.000 células T de las cual se extrajo ARN mensajero con Trizol (Ambion). Una vez obtenido el ARN mensajero, se llevó a cabo la retrotranscripción del mismo, poniendo la misma cantidad de ARNm en todas las muestras. Tras esto, se diluyó el ADN complementario (ADNc), y se llevó a cabo la PCR en tiempo real de todas las muestras por duplicado, utilizando los

20 cebadores adjuntados en la Tabla 1.

Tabla 1 Cebadores utilizados para la RT-PCR.	Secuencia (5' → 3')
Fw GFP	AAGCTGACCCTGAAGTTCAT
Rev GFP	CGTCGTCCTTGAAGAAGAT
Fw CD3	AAGATGAAGTGGAAGGCG
Rev CD3	CTCAGGAACAAGGCAGTG
Fw CD4	AGAAAGACGCAAGCCCAG
Rev CD4	GCAGCACCCAGAAGCAAGT
Fw GAPDH	ATGGGGGAAGGTGAAGGTCCG
Rev GAPDH	GGGGTCATTGATGGCAACAATA

7. Citometría de flujo

Para los experimentos de citometría de flujo, se tiñeron entre 20.000 y 50.000 células con diferentes anticuerpos, que se adjuntan en la Tabla 2.

Diana anticuerpo	Fluorocromo	Uso	Concentración	Casa comercial
CD3	PerCP-Cy5.5	Marcador de células T	1:100	eBiosciences
CD8	APC	Marcador subpoblación células T	1:100	eBiosciences
CD45RA	PE	Fenotipo células T	1:100	eBiosciences
CD62L	PE-Cy7	Fenotipo células T	1:100	eBiosciences
EGFRt	PE	Identificación CAR	1:50	Biolegend

Tabla 2 | Anticuerpos utilizados previo a la lectura por citometría de flujo.

8. Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism 6, utilizando la media, la desviación estándar asociada a la media (SEM), y el test T de Student para datos no pareados, con dos colas y con una significancia *** para $p < 0,001$.

Resultados

Diseño *in silico* de los promotores quiméricos

El primer paso para la consecución de este trabajo fue diseñar los promotores que utilizaríamos posteriormente para regular la expresión de eGFP y del CAR.

- 10 β -2 microglobulina (B2M), se ha visto que puede presentar un patrón de expresión similar al del TCR. B2M es una proteína estructural del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, presente en todas las células nucleadas. Su presencia es fundamental para la estabilidad de la unión antigénica a este complejo, mientras que su ausencia hace que no se puedan desarrollar las células T CD8+.
- 15 Los promotores derivados de B2M se diferencian en la presencia o ausencia de la región TetO, así como en la posición del enhancer definido por Ensembl.

Tras esto, clonamos los promotores en esqueletos lentivirales GFP y seleccionamos las construcciones para clonarlos en esqueletos lentivirales que contienen el CAR (Fig. 1A).

Generación de células T GFP+ con los promotores quiméricos

- 20 Una vez tenemos nuestros promotores clonados en un esqueleto lentiviral GFP+, generamos vectores lentivirales para poder transducir células T primarias, lo que nos permitirá generar células T que expresen nuestro gen reportero eGFP bajo cada uno de los promotores previamente diseñados.

Generamos los vectores lentivirales siguiendo el procedimiento explicado con anterioridad y, paso previo a transducir células T, se calculó el título de nuestros vectores. Una vez titulados nuestros vectores virales, seguimos el mismo proceso para transducir células T primarias previamente aisladas, partiendo de una población de células T (CD3+) mayor del 70%.

B2M mimetiza el patrón de expresión del TCR

Para estudiar la expresión de GFP bajo el control de los promotores derivados de B2M, se estudiaron tanto la proteína como el ARN mensajero. Así, generamos las cinéticas de proteína y de mensajero de GFP y CD3.

10 Los datos se analizaron a partir de la mediana de fluorescencia tanto de GFP como del fluorocromo conjugado con el anticuerpo que va dirigido frente a CD3 en los diferentes puntos temporales

Respecto a los promotores derivados de B2M, a nivel de proteína, podemos observar en la que en *B2M Enh5'*, la expresión de GFP replica fielmente la expresión fisiológica de CD3. En el caso de B2M, GFP aumenta su expresión en el intervalo de 0 a 8 horas, al contrario que en el caso de CD3. Curiosamente, los vectores *B2M TetO*, donde la única diferencia con B2M es la inserción del operón TetO a 10 pb del sitio de inicio de transcripción, el patrón de expresión de GFP es más similar al de CD3, al observarse ese incremento de expresión a las 8 horas.

20 A nivel de ARN mensajero se observa un patrón muy parecido al de proteína, siendo el vector *B2M Enh5'* el que mejor mimetiza el patrón de CD3, seguido del promotor *B2M TetO*. Aunque en ambos casos, la bajada de expresión de eGFP a las 8 horas es más pronunciada que la observada en CD3. A partir de las 8 horas, el patrón entre eGFP y CD3 es prácticamente idéntico.

25 **El fenotipo de las células T GFP+ cambia con el tiempo hacia un estado de mayor diferenciación.**

De manera paralela al estudio de la cinética de expresión de GFP bajo el control de los promotores quiméricos en las células T, se realizó un estudio de la evolución temporal del fenotipo celular, utilizando para ello dos anticuerpos, uno frente a CD62L, y otro frente a CD45RA, una isoforma de CD45 que conserva los 3 exones, por lo que presenta el mayor peso molecular de todas las isoformas. La expresión selectiva en membrana de estos marcadores nos permite distinguir 4 fenotipos propios de células T: células T

troncales memoria, células T memoria central, células T efectoras y células T efectoras memoria.

En el caso del promotor B2M la población celular a 7 días sigue siendo en gran medida troncal memoria.

5 **Generación de células T CAR+ con el promotor quimérico B2M.**

Una vez obtenidos los resultados utilizando GFP como transgén, clonamos el promotor BM2 en el vector CAR. Una vez clonado el promotor en el esqueleto lentiviral del CAR de tercera generación, y generados los vectores lentivirales tal y como se detalla en la sección materiales y métodos, se transdujeron las células T con los vectores CAR.

- 10 En esta construcción (Fig. 1 y Fig. 2), los LTRs permiten la integración. EGFRt codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado, que permite deplecionar las células CAR+ en caso de ser necesario (utilizando un anticuerpo monoclonal, cetuximab) y permite la detección indirecta del CAR utilizando un anticuerpo frente a este EGFRt conjugado con un fluorocromo. T2A es un péptido de autoescisión, que
15 permite cortar un péptido largo en dos péptidos cortos (pues el CAR y EGFRt se codifican juntos como una proteína recombinante, y se separan gracias a este mecanismo). WPRE es un elemento de regulación post-transcripcional que potencia tanto el título del vector viral como la expresión del transgén.

- Se utilizaron células T frescas, procesadas por inmunoselección magnética negativa a
20 partir de sangre periférica movilizada de un donante sano. La transducción se llevó a cabo mediante espinoculación, utilizando 50 µL de vector en 100.000 células T. La expresión del CAR se determinó 72 horas post – transducción. Con el promotor B2M, se observó un porcentaje de expresión del CAR del 18%. Se utilizó CAR3G (el vector lentiviral original en el que el CAR se expresa bajo el control del promotor EF1-α) como
25 control positivo de tinción y de transducción. Las células NTD se utilizaron como control negativo.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprenda o consista en la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2, o que comprenda o consista en una secuencia que presente una identidad con la SEQ ID NO: 1 o 2 de al menos un 95%.
5
2. Un polinucleótido que comprenda o consista en la secuencia SEQ ID NO: 1, o que comprenda o consista en una secuencia que presente una identidad con la SEQ ID NO: 1 de al menos un 95%.
- 10 3. Un polinucleótido que comprenda o consista en la secuencia SEQ ID NO: 2, o que comprenda o consista en una secuencia que presente una identidad con la SEQ ID NO: 2 de al menos un 95%.
- 15 4. Un polinucleótido que consista en la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2.
5. Un polinucleótido que consista en la secuencia SEQ ID NO: 1.
6. Un polinucleótido que consista en la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 20 7. Una construcción genética que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. La construcción genética según la reivindicación 7, donde dicha construcción génica es un vector viral.
- 25 9. La construcción genética según la reivindicación 8, donde el vector viral es un vector lentiviral.
- 30 10. La construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el promotor se encuentra operativamente unido a un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular.
- 35 11. Una célula transformada o transducida con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.

12. La célula según la reivindicación 11, donde dicha célula es una célula inmune.

5 13. La célula inmune según la reivindicación 12, donde dicha célula se selecciona de la lista que consiste en linfocitos inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos auxiliares.

10 14. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, o la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para su uso en terapia.

15 15. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, o la célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para su uso en el tratamiento de cáncer, donde preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en neoplasias, neoplasias de células B, linfoma, leucemia y/o mieloma.

FIGURAS

FIG.1

A)

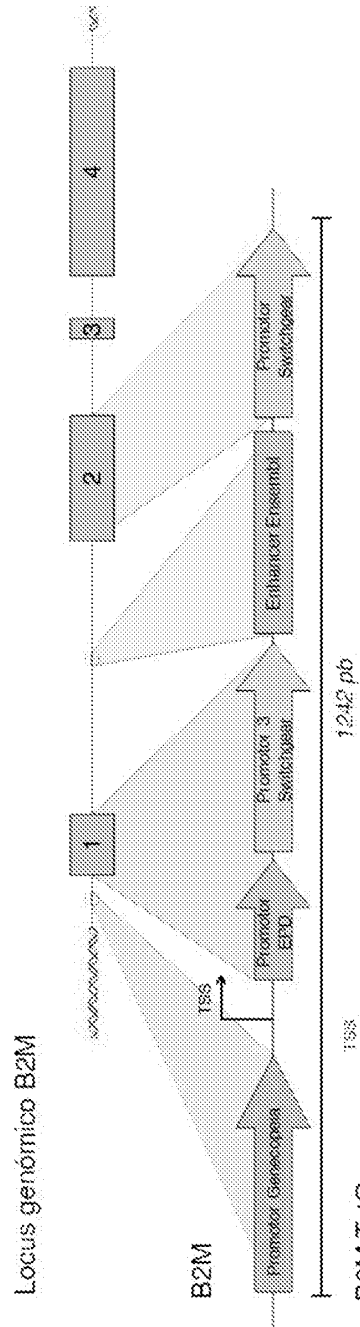


FIG.1 (CONT.)

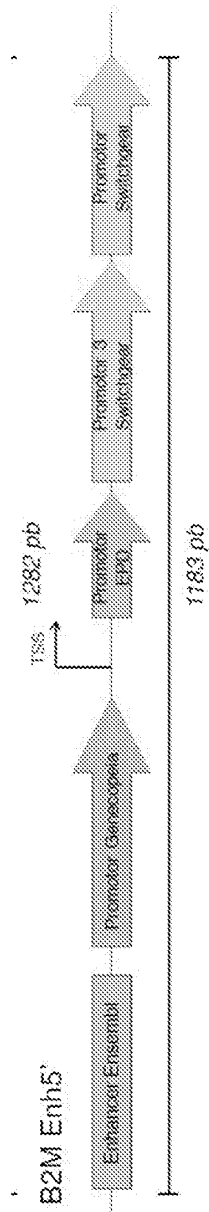
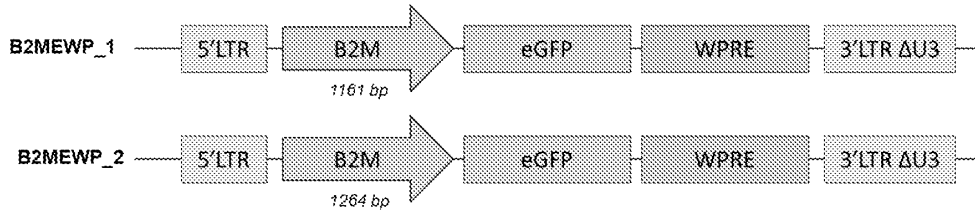


FIG.1 (CONT.)

B)



C)

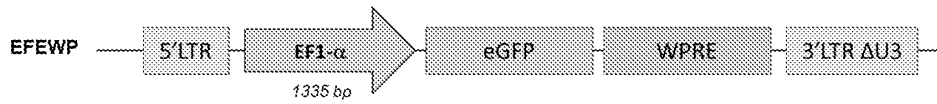


FIG. 2

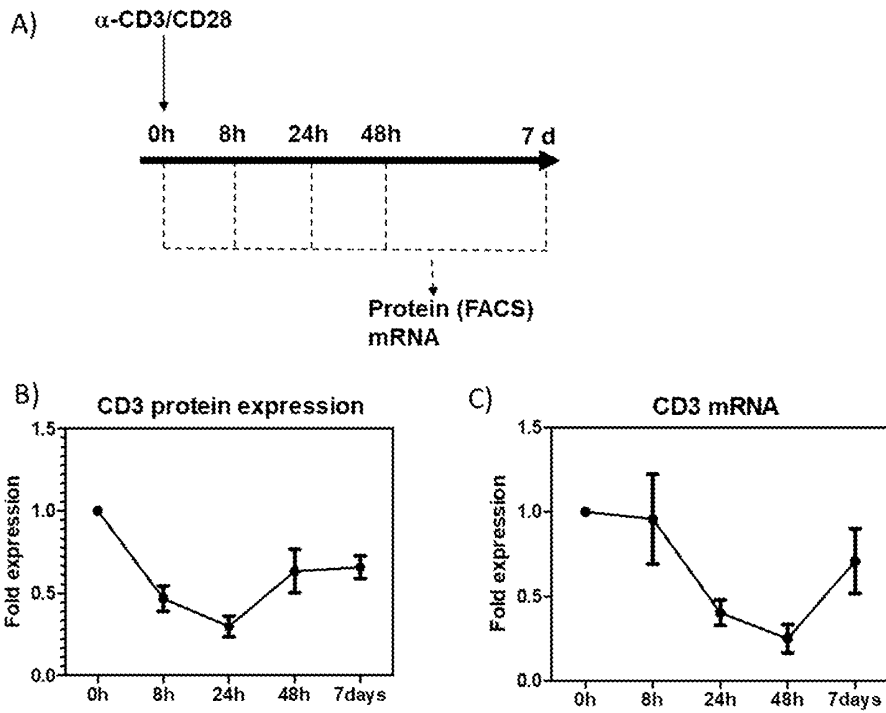
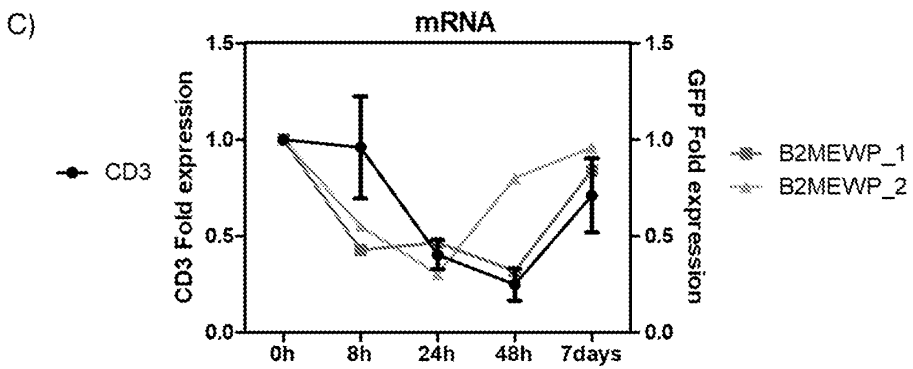
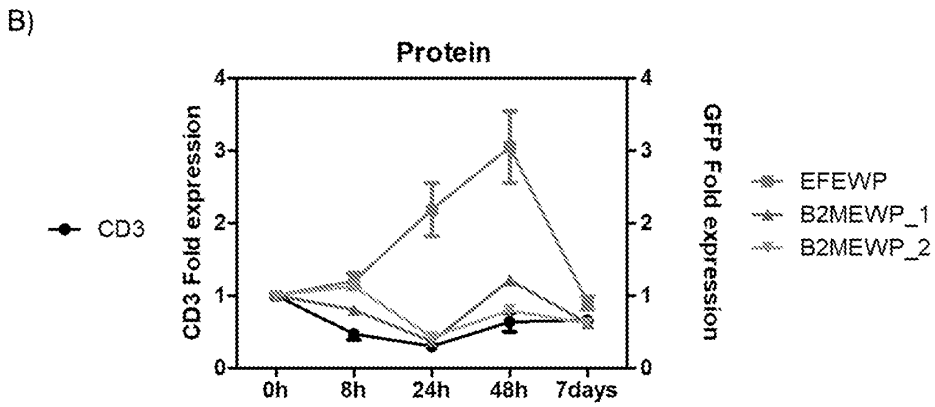
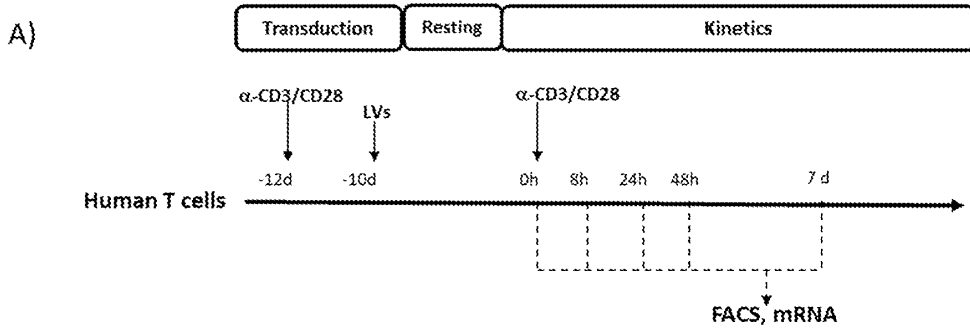


FIG. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2021/070684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE BIOSIS, EMBL-EBI NUCLEOTIDE DATABASES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018213332 A1 (SEATTLE CHILDRENS HOSPITAL DBA SEATTLE CHILDRENS RES INST) 22/11/2018, the whole document.	1-15
A	TRISTAN-MANZANO M ET AL., "LVs development for a fine-tuned regulation of CARs in T cells." Human Gene Therapy (2019), Vol. 30, N° 11, páginas A71 - A72, ISSN 1557-7422 (print), <DOI:10.1089/hum.2019.29095.abstracts> the whole document.	1-15
A	CN 110055281 A (UNIV SHANDONG 2ND HOSPITAL) 26/07/2019, the whole document.	1-15
A	CN 108018312 A (SHANGHAI UNICAR THERAPY BIO MEDICINE TECH CO LTD) 11/05/2018, the whole document.	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 03/01/2022	Date of mailing of the international search report (11/01/2022)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer M. Hernández Cuéllar Telephone No. 91 3498409
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2021/070684

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN110055281 A	26.07.2019	CN110055281B B	01.09.2020
-----	-----	-----	-----
WO2018213332 A1	22.11.2018	JP2020520922 A	16.07.2020
		US2020095573 A1	26.03.2020
		CN110913871 A	24.03.2020
		CA3063695 A1	22.11.2018
		AU2018270156 A1	19.12.2019
		EP3624814 A1	25.03.2020
		EP3624814 A4	24.02.2021
-----	-----	-----	-----
CN108018312 A	11.05.2018	CN108018312B B	10.09.2019
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070684

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/10 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A61K35/17 (2015.01)

A61P35/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2021/070684

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE BIOSIS, EMBL-EBI NUCLEOTIDE DATABASES

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2018213332 A1 (SEATTLE CHILDRENS HOSPITAL DBA SEATTLE CHILDRENS RES INST) 22/11/2018, todo el documento.	1-15
A	TRISTAN-MANZANO M ET AL., "LVs development for a fine-tuned regulation of CARs in T cells." Human Gene Therapy (2019), Vol. 30, Nº 11, páginas A71 - A72, ISSN 1557-7422 (print), <DOI:10.1089/hum.2019.29095.abstracts> todo el documento.	1-15
A	CN 110055281 A (UNIV SHANDONG 2ND HOSPITAL) 26/07/2019, todo el documento.	1-15
A	CN 108018312 A (SHANGHAI UNICAR THERAPY BIO MEDICINE TECH CO LTD) 11/05/2018, todo el documento.	1-15

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
03/01/2022

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
11 de enero de 2022 (11/01/2022)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Hernández Cuéllar

Nº de teléfono 91 3498409

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. Con respecto a las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
 - a. que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
 - en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - en formato papel o en formato de archivo de imagen.
 - b. presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13.ter.1a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - c. Presentada con posterioridad a la fecha de presentación únicamente a los fines de la búsqueda internacional:
 - en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13ter.1a).
 - en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13ter.1b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2021/070684

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
CN110055281 A	26.07.2019	CN110055281B B	01.09.2020
-----	-----	-----	-----
WO2018213332 A1	22.11.2018	JP2020520922 A	16.07.2020
		US2020095573 A1	26.03.2020
		CN110913871 A	24.03.2020
		CA3063695 A1	22.11.2018
		AU2018270156 A1	19.12.2019
		EP3624814 A1	25.03.2020
		EP3624814 A4	24.02.2021
-----	-----	-----	-----
CN108018312 A	11.05.2018	CN108018312B B	10.09.2019
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N15/10 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A61K35/17 (2015.01)

A61P35/00 (2006.01)