



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



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

Programa de Doctorado en Biomedicina

TESIS DOCTORAL

**Optimización de la inmunoterapia antitumoral con
células CAR-T mediante el control de la expresión
génica**

MARÍA TRISTÁN MANZANO

Director: Francisco Martin Molina

Granada, 23 Junio 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Tristán Manzano
ISBN: 978-84-1306-990-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/70153>

El doctorando / *The doctoral candidate* **María Tristán Manzano** y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: **Francisco Martín Molina**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de 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, 23 junio de 2021

Director de la tesis / *Thesis supervisor;*

Francisco Martin Molina

Doctorando / *Doctoral candidate:*

María Tristán Manzano

Firma / *Signed*

Firma / *Signed*

Resumen

Las células T que expresan receptores de antígeno quimérico (CAR-T, del inglés, *Chimeric Antigen Receptor T cells*) han revolucionado las estrategias actuales de inmunoterapia frente al cáncer, exhibiendo un éxito impresionante para el tratamiento de tumores hematológicos de linaje B refractarios/recidivantes CD19+. Estos receptores CAR son proteínas quiméricas que combinan un dominio de unión, derivado generalmente de un anticuerpo monoclonal con un dominio de señalización intracelular derivado del receptor de la célula T (TCR) y de correceptores como CD28 y/o 4-1BB. Estos CARs expresados en la superficie de las células T, dirigen y determinan su actividad hacia las células diana que expresan el antígeno frente al que están diseñadas. Actualmente han sido aprobados más de cinco productos CAR-T como medicamento de terapias avanzadas (ATMP) por las agencias de medicamento americana, europea y más recientemente, china, desde su inicio en 2017.

Sin embargo, estas terapias CAR-T aún presentan limitaciones importantes debido a efectos secundarios muy graves (como la tormenta de citoquinas o los eventos neurológicos adversos), así como una falta persistencia a largo plazo en el 40-50% de los pacientes de leucemia y linfomas tratados y presentando una respuesta aún más pobre frente a tumores sólidos.

A día de hoy, la gran mayoría de las células CAR-T se generan utilizando vectores retrovirales con promotores de expresión fuerte y constitutiva que generan una alta densidad de CAR en la superficie de la célula y con ello, provocan en muchos casos, una excesiva señalización tónica en ausencia del antígeno, agotamiento prematuro y una estimulación crónica que reducen la eficacia y comprometen la seguridad de la terapia.

Con la intención de contribuir en la mejora de las estrategias de inmunoterapia, el objetivo principal de la presente tesis doctoral persigue mejorar la funcionalidad de las células CAR-T mediante la optimización de las herramientas de modificación genética que se utilizan para su generación. Así, nos planteamos la optimización y desarrollo de vectores lentivirales orientados a incrementar la seguridad y eficacia de las células CAR-T mediante el control de la expresión génica a través de dos abordajes diferentes, ya sea de forma endógena (regulado por el estado de activación de la propia célula T) o exógena (mediante la administración de doxiciclina).

En primer lugar, generando vectores lentivirales que permitan el control de la expresión del CAR mimetizando una regulación fisiológica, es decir, imitando comportamiento natural del TCR; y en segundo lugar, con un vector lentiviral inducible que permita el control exógeno de cualquier gen de interés, incluyendo proteínas de relevancia terapéutica en las células T,

solamente en presencia de un inductor inocuo y en unas condiciones que puedan ser aplicables a clínica.

En la primera estrategia, hemos demostrado que los vectores lentivirales que expresan el CAR a través de un promotor basado en el locus del Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), tenían un patrón de expresión muy similar al del TCR tras la estimulación antigénica, exhibiendo una bajada en la densidad del CAR en membrana y restaurándose a niveles basales a los pocos días. Esta cinética, contraria a la observada con las células CAR-T comerciales que se expresan bajo el promotor fuerte EF1 α (como el CAR clínico de segunda generación ARI-001), produjo células AW-CAR-T (AWARI) con una mejor funcionalidad, al presentar una mayor proporción de células T troncales memoria, un menor agotamiento y menor señalización tónica, así como unos niveles de secreción menos agresivos de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IFN γ tras la lisis eficiente de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Además, utilizando un modelo artificial *in vitro* de tumor de páncreas CD19+, hemos demostrado que las células AWARI tienen una mayor actividad lítica específica que las ARI tras varias re-estimulaciones antigénicas. Estos resultados demuestran que el vector lentiviral AW puede constituir una alternativa interesante para la generación de productos CAR-T con mejores características.

Finalmente, dado que la expresión del CAR ARI-001 controlada por el vector AW mejora sus propiedades, nos centramos en demostrar la factibilidad de producir células CAR-T AWARI a gran escala en condiciones cercanas a GMP.

Considerando todo lo anterior, hemos propuesto las células CAR-T AWARI para la realización de un ensayo clínico con la finalidad de determinar si realmente se logra mejorar los resultados de las células CAR-T ARI-001, tanto en términos de eficacia como de reducción de los efectos secundarios.

Respecto a la segunda estrategia, nos planteamos la generación de células CAR-T que pudieran ser controladas de forma exógena. Nuestro objetivo final es poder controlar la actividad de la célula CAR-T gracias al control de la expresión de cualquier proteína mediante la administración de un fármaco inocuo. Esta herramienta incrementaría así la potencia de las células CAR-T, contribuyendo a generar nuevas células CAR-T de cuarta generación inducibles (denominadas iTRUCKs). Las diferentes moléculas de relevancia inmuno-terapéutica incluyen citoquinas muy potentes como (IL-12, IL-18, IFN, TNF α , entre otras), que no deben ser expresadas de manera continua en las células CAR-T, y por tanto, se requiere de un control de la expresión muy preciso, versátil e inducido por un fármaco inocuo.

El grupo de investigación había desarrollado previamente los vectores lentivirales Lent-On-Plus, sin (LOP) o con un aislador en el LTR 3' (LOP-Is2), capaces de controlar la expresión

en células embrionarias y otras células de interés. Este sistema es un vector “todo-en-uno”, que no requiere de transactivadores (importante para la traslación a clínica) y que ha demostrado regulación de la expresión de diferentes transgenes sin necesidad de tener una población pura (clonal). En esta tesis hemos demostrado que el sistema LOP es capaz de controlar la expresión en las diferentes subpoblaciones de células T primarias humanas, pero que para ello requieren de la presencia del elemento aislador IS2.

Este vector LOP-IS2 permitió la generación eficiente de células T primarias inducibles que respondieron a 100 pg/ml de doxiciclina (Dox), alcanzando la expresión máxima en 1-10 ng/ml. El sistema LOPIS2 permite controlar la expresión en modelos *in vivo* a una concentración de Dox de 10-100 ng/ml administrada en gelatina. Destacamos que estas concentraciones están por debajo de la dosis terapéutica como bacteriostático, minimizando así el riesgo de resistencia antibióticos y aumenta el potencial para una aplicación clínica futura más segura.

Finalmente, como prueba de concepto, validamos la funcionalidad y versatilidad del sistema generando células CAR-T inducibles de tercera generación (α CD19-41BB-CD28 ζ). Estas células iCAR-T fueron capaces de mostrar una citotoxicidad específica frente a células tumorales CD19+ sólo en presencia de Dox.

Los resultados obtenidos con el sistema LOP-Is2 determinan su potencial y versatilidad como herramienta para regular la expresión de diferentes transgenes en células T primarias humanas en un entorno clínico debido a la ausencia de transactivadores y a las bajas dosis de doxiciclina requeridas.

Esto abre la puerta a explorar nuevas estrategias de inmunoterapia para poder expresar de forma controlada, nuevas moléculas proteicas que, por su toxicidad, no han podido considerarse para ser expresados por las células CAR-T o en otros tipos celulares como los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1	NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE LINAJE B	23
1.1	Leucemia linfoblástica aguda-B.....	25
1.2	Leucemia Linfocítica Crónica.....	25
1.3	Linfoma de Hodgkin	26
1.4	Linfomas No-Hodgkin.....	26
1.5	Mieloma Múltiple.....	27
1.6	Diferenciación de las células B: dianas terapéuticas.....	28
2	SISTEMA INMUNOLÓGICO Y LAS CÉLULAS T	30
2.1	El sistema inmunitario y la importancia de la inmuno-vigilancia frente al cáncer	30
2.2	Linfocitos T y su papel antitumoral	32
2.2.1	Clasificación de las células T en función de su estadio de diferenciación	33
2.2.2	Señales en la activación del linfocito T.....	34
2.2.3	Co-receptores inhibidores.....	37
2.2.4	Señalización por citoquinas.....	37
2.2.5	Transducción de la señalización de las células T y sinapsis inmunológica	38
2.3	Balance entre activación: sobreactivación y agotamiento.	40
2.3.1	Muerte inducida por activación (AICD).....	40
3	INMUNOTERAPIA PARA EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER.....	41
3.1	Concepto de inmunoterapia	41
3.2	Tipos de inmunoterapia	42
3.2.1	Terapia con anticuerpos monoclonales y puntos de control inmunológico.....	42
3.2.2	Virus oncolíticos en inmunoterapia antitumoral	45
3.2.3	Terapia antitumoral con citoquinas	46
3.2.4	Inmunomoduladores frente al cáncer.....	47
3.2.5	Terapia celular adoptiva.....	49
3.3	Medicamentos de inmunoterapia frente a tumores hematológicos: necesidad clínica y mecanismos de resistencia	50
4	TERAPIA CELULAR-GÉNICA: INGENIERÍA DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO	53
4.1	Ingeniería de linfocitos T.....	53
4.1.1	Terapia con TCR transgénicos.....	54
4.1.2	Terapia con Receptores antigénicos quiméricos (CARs).....	55

4.2	Ingeniería de otras células del sistema inmunitario	57
4.2.1	Células NK-CAR.....	57
4.2.2	Macrófagos-CAR.....	58
5	RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS (CARs)	59
5.1	Estructura y Biología de los CARs.....	59
5.1.1	Evolución de las células CAR-T y funcionalidad.....	59
5.2	Nuevos diseños de células CAR-T.....	63
5.2.1	Nuevos diseños en el ectodominio	64
5.2.2	CARs multi-diana	65
5.2.3	Células CAR-T programadas endógenamente: Split-CARs	65
5.2.4	Células T CAR Universales	66
6	HERRAMIENTAS DE TERAPIA GÉNICA PARA GENERAR Y OPTIMIZAR LAS CÉLULAS CAR-T	68
6.1	Vectores virales	68
6.1.1	Vectores retrovirales: γ -retrovirales vs lentivirales	69
6.2	Edición genómica en ingeniería de linfocitos.....	72
7	TERAPIA CAR-T PARA NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	74
7.1	Células CAR-T comerciales: indicaciones, estructura y composición.....	74
7.2	Generación y manufactura de células CAR-T a gran escala de grado clínico.....	78
7.3	Limitaciones de las terapias CAR-T frente a CD19	79
7.3.1	Limitaciones de las terapias CAR-T frente a CD19: efectos secundarios	80
7.3.2	Limitaciones de las terapias CAR-T frente a CD19: falta de eficacia terapéutica, persistencia y escape tumoral.....	85
8	ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA EFICACIA Y SEGURIDAD EN LA TERAPIA CON CÉLULAS CAR-T	89
8.1	Ingeniería de proteínas para mejorar y controlar la función de la proteína CAR	89
8.2	Mejoras en los procedimientos de aislamiento, cultivo y modificación genética de las células T.....	90
8.3	Mejoras en los sistemas de modificación genética con la finalidad de controlar los niveles del CAR y otros genes.....	90
	Estrategias para mejorar los CAR-T a través del control de la expresión	91
8.3.1	Control de la expresión del CAR: niveles y cinética de expresión.....	92
8.3.2	Sistemas inducibles para regular la actividad de las células CAR-T	93
	HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	101
	OBJETIVOS	104
	MATERIALES Y MÉTODOS	107
1.	Cultivo celular.....	107

2. Plásmidos y vectores lentivirales utilizados	108
3. Producción de partículas virales	110
4. Transducción	112
5. Generación de los modelos tumorales CD19+	113
6. Citometría de flujo	113
7. Ensayos funcionales	114
8. Análisis de inducibilidad y reversión	116
9. Modelos animales y análisis de bioluminiscencia	117
10. Producción a gran escala de células CAR-T en el biorreactor Clinimacs Prodigy en condiciones similares a GMP.....	118
11. Extracción de ARN y PCR cuantitativa	118
12. Análisis de los sitios de unión de factores de transcripción.....	119
13. Análisis estadísticos.....	119
14. lista de anticuerpos, secuencias y software.....	119
RESULTADOS: PARTE I.....	122
Desarrollo de las herramientas necesarias para la generación de células CAR-T frente a tumores CD19+.....	122
1.1 Aislamiento y expansión de células T primarias de donante sano.	122
1.2 Optimización de la transducción de células T primarias con VLS para una modificación genética estable	123
RESULTADOS: PARTE II.....	125
Desarrollo de modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para determinar la lisis tumoral y eficiencia terapéutica.....	125
RESULTADOS: PARTE III.....	128
Generación de células antiCD19-CAR-T con una expresión fisiológica	128
3.1 Estudio del patrón de expresión del TCR/CD3	129
3.2 Comportamiento de diferentes promotores en el contexto de VL expresando GFP	130
3.3 El promotor WAS como candidato para terapia con células CAR-T.....	132
3.4 La expresión del CAR en células T bajo el promotor AW mimetiza el patrón del CD3/TCR.....	133
3.5 Las células AWARI-CAR-T tienen menos señalización tónica y menor agotamiento a nivel basal.....	134
3.6 El patrón de expresión del CAR similar al TCR previene el agotamiento y controla la secreción de citocinas proinflamatorias tras la exposición al antígeno <i>in vitro</i>	136
3.7 Las células AWARI-CAR-T son más eficaces en un modelo de tumor pancreático CD19+.....	139
RESULTADOS: PARTE IV	141

Ensayos preclínicos de funcionalidad <i>in vivo</i> de las nuevas células CAR-T fisiológicas y su escalabilidad en la producción clínica	141
4.1 Las células AWARI-CAR-T son igual de eficientes erradicando células de linfoma <i>in vivo</i> que las células ARI-CAR-T pero manteniendo un fenotipo menos diferenciado	141
4.2 Escalabilidad en la producción de las células CAR-T fisiológicas en un biorreactor CliniMACs Prodigy	147
4.3 Los productos AWARI-CAR-T producidos a gran escala son muy eficientes en la eliminación del tumor y mantienen buena proporción de células T _{SCM} y T _{CM} <i>in vivo</i>	149
RESULTADOS: PARTE IV	154
Generación de células T- inducibles basados en el sistema TET-ON libre de transactivadores como potencial herramienta de aplicación en inmunoterapia	154
5.1 Los vectores inducibles “ <i>todo-en-uno</i> ” basados en el TetR original requieren la presencia de aisladores para una regulación estricta en células T primarias	154
5.2 El aislador Is2 ha de localizarse dentro del LTR para una expresión controlada en las células T primarias.....	158
5.4 Caracterización del Sistema LOP-IS2: Regulación en diferentes tipos celulares, inducibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , sensibilidad a Dox.....	161
5.5 Análisis de la sensibilidad del CELETIS2 a diferentes concentraciones de inductor (Doxiciclina y Tetraciclina).....	163
5.6 Análisis de la cinética de pérdida de expresión (reversibilidad) en ausencia de inductor.....	164
5.7 Análisis de la inducibilidad del sistema LOP-Is2 <i>in vivo</i>	164
5.7.1 Análisis de la inducibilidad <i>in vivo</i> del sistema LOP-Is2 expresando eGFP.....	165
5.7.2 Análisis de la inducibilidad <i>in vivo</i> del sistema LOPIS2 expresando eGFP-2A-Nluc... 167	
5.8 El sistema LentOnPlus-Is2 es un sistema versátil que permite la regulación de grandes transgenes: Generación de células CAR-T inducibles (iCAR-T)	169
5.8.1 Determinación de la inducibilidad del vector LOPIS2-CAR.....	169
5.8.2 Determinación de la dependencia de Dox de las células T-iCAR para eliminar sus células diana (CD19+)	171
DISCUSIÓN	174
Modelos tumorales CD19+.....	174
Regulación fisiológica para mejorar las propiedades de las células CAR-T.....	176
Regulación externa: sistemas inducibles para incrementar las posibilidades terapéuticas de las células CAR-T.....	183
Producción a gran escala en condiciones similares a GMP.....	187
CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA.....	192
PUBLICACIONES.....	204

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de muertes por cáncer en 2020 a nivel mundial en ambos sexos en la población menor de 40 años.....	24
Figura 2. Estadíos de diferenciación asociados a los principales tumores hematológicos de linaje B y expresión de algunos marcadores de superficie.....	28
Figura 3. Características fenotípicas y funcionales de los diferentes estadios de diferenciación de las células T post-tímica.	34
Figura 4. Representación esquemática de la activación de la célula T que conllevan a mecanismos con actividad lítica directa o no líticos. T.	36
Figura 5. Representación esquemática de las principales moléculas que participan en la señalización del TCR en la célula T.....	39
Figura 6. Proceso de modificación genética y manufactura en la terapia con ingeniería de linfocitos....	54
Figura 7. Relación de carga mutacional tumoral (TMB), frecuencia de neoantígenos y predicción del éxito de aplicación de terapia con células CAR-T.....	57
Figura 8. Estructura en las diferentes generaciones del CAR.....	63
Figura 9. Representación de los nuevos diseños de CARs más relevantes.....	67
Figura 10. Representación de los procesos que median la CRS y el ICANs tras la administración de las células CAR-T.....	85
Figura 11. Representación esquemática del funcionamiento del sistema TetOn en presencia y ausencia de transactivador	96
Figura 12. Eficiencia de aislamiento de las células T primarias y óptima activación con la nanomatriz anti-CD3/CD28.....	123
Figura 13. Optimización de la transducción de células T primarias	124
Figura 14. Generación de los modelos CD19+ GFP+Nanoluc+.	126
Figura 15. Generación de un modelo artificial CD19+ de tumor pancreático	128
Figura 16. Estimulación con matriz α CD3/CD28 para mimetizar una presentación antigénica artificial vía TCR.....	129
Figura 17. Las células T transducidas con VLs que incluyen el promotor WAS imitan parcialmente el patrón de expresión de TCR	131
Figura 18. Características del promotor AW.....	133
Figura 19. Comparativa de los niveles de CAR dados por el control de los promotores EF1a y AW.	134

Figura 20. Señalización tónica y agotamiento basal en ausencia de estimulación antigénica.....	135
Figura 21. Las células AWARI-CAR-T demuestran la misma eficacia antitumoral <i>in vitro</i> frente a tumores CD19+ que ARI con una menor secreción de citoquinas proinflamatorias.....	137
Figura 22. Análisis de marcadores de agotamiento y fenotipo tras la lisis de células CD19+	138
Figura 23. Caracterización de la actividad lítica y fenotipo células ARI y AWARI en un modelo artificial CD19+ de tumor pancreático <i>in vitro</i>	140
Figura 24. Eficacia terapéutica <i>in vivo</i> de las células ARI y AWARI-CAR-T en un modelo de linfoma de Burkitt.....	142
Figura 25. Análisis por bioluminiscencia de la eficacia terapéutica de las células ARI y AWARI CAR-T en modelos xenogénicos de linfoma de Burkitt humano	143
Figura 26. Presencia de células de Namalwa-GFP-Nluc detectadas en bazo, médula ósea, hígado, sangre y cerebro.....	144
Figura 27. Caracterización fenotípica de las células CAR-T ARI y AWARI infiltradas en los diferentes órganos de los ratones.	146
Figura 28. Análisis fenotípico de las células ARI y AWARI-CART infiltradas en el bazo de los ratones tratados	147
Figura 29. Producción a gran escala de las células AWARI CAR-T en condiciones similares a GMP ..	148
Figura 30. Actividad antitumoral <i>in vivo</i> de células AWARI-CAR-T producidas por CliniMACS después de una o dos exposiciones a células tumorales de linfoma.....	150
Figura 31 Análisis de infiltrados de células de linfoma y de células AWARI en los diferentes órganos de los ratones tratados.	151
Figura 32. Análisis del fenotipo de células AWARI-CAR-T producidas en el CliniMACS después de uno o dos exposiciones a células Namalwa <i>in vivo</i>	153
Figura 33. Comportamiento de los vectores Tet-On en células T inmortalizadas	155
Figura 34. Comportamiento de los diferentes VL-TetOn en células T primarias.....	157
Figura 35. Análisis de la inducibilidad de los vectores CEET y CEETIs2 en los diferentes estadios de diferenciación de las células T primarias.....	158
Figura 36. Vectores LOP con elementos aisladores fuera del LTR.....	159
Figura 37. Evaluación del comportamiento de los nuevos aisladores en diferentes tipos celulares.	160
Figura 38. Comportamiento de LV eGFP-NanoLuc Lent-on-plus en líneas celulares <i>in vitro</i>	163
Figura 39. Sensibilidad a los derivados de tetraciclinas del vector CELETIS2 <i>in vitro</i>	163

Figura 40. Reversión del sistema LOP-Is2 <i>in vitro</i>	164
Figura 41. Comportamiento de las células Jurkat-LOP <i>in vivo</i>	166
Figura 42. Análisis de inducibilidad del sistema LOP y LOP-Is2 <i>in vivo</i>	168
Figura 43. El sistema LOP-Is2 es una herramienta versátil para el control de la expresión de un CAR de tercera generación en líneas celulares.	170
Figura 44. Inducibilidad del iCAR-Is2 en células T primarias	171
Figura 45. Las células T iCAR-Is2 exhiben lisis celular CD19 + específica en presencia de Dox.	172
Figura 46. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la regulación de la expresión del CAR a través de los promotores EF1a y WAS.....	182
Figura 47. La configuración del Is2 dentro del 3'LTR es la única configuración posible para la regulación inducible en células T primaria.	186

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales frente a neoplasias hematológicas aprobados para clínica.	43
Tabla 2. Anticuerpos monoclonales aprobados como ICICs para la terapia antitumoral.	44
Tabla 3. Inhibidores utilizados en clínica para el tratamiento de neoplasias hematológicas tanto en monoterapia como con anticuerpos monoclonales.	48
Tabla 4. Resumen de los medicamentos para el tratamiento oncológico de los tumores de linaje de células B utilizados en España según la AEMPs.	51
Tabla 5. Año de aprobación del uso del ATMP-CAR-T frente a los diferentes tumores hematológicos CD19+ por una agencia reguladora.	75
Tabla 6. Comparativa de las características estructurales/técnicas de los diferentes ATMPs aprobados. ...	78
Tabla 7. Porcentajes de efectos secundarios graves de la administración de los siguientes ATMPs.	83
Tabla 8. Potenciales cambios en los diferentes módulos de arquitectura proteica del CAR para modular su actividad y funcionalidad de manera sinérgica.	89
Tabla 9 Características de los estudios CAR-inducibles por Dox.	98
Tabla 10. Anticuerpos	119
Tabla 11 Software utilizado.....	120
Tabla 12 Lista de oligonucleótidos utilizados	120

ABREVIATURAS

A lo largo de la Tesis se utilizarán varias abreviaturas procedentes del inglés. Esto se debe al extendido uso del inglés en las publicaciones científicas y para una comprensión más fácil, se mantendrán así en algunos casos específicos.

ACT	Terapia celular adoptiva, del inglés <i>Adoptive Cell Therapy</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AdV	Vectores adenovirales, del inglés <i>Adenoviral vectors</i>
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
AICD	Muerte celular inducida por activación, del inglés <i>Activation induced cell death</i>
aMLV	Virus de leucemia murino anfotrópico, del inglés, <i>Amphotropic murine leukemia virus</i>
APC	Células presentadoras de antígenos, del inglés, <i>Antigen-presenting cell</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATMP	Medicamento de terapias avanzadas, del inglés, <i>Advanced therapy medicinal product</i>
β2M	β2-microglobulina
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>
BHE	Barrera hematoencefálica
BiTE	Anticuerpo biespecífico de unión a células B, del inglés, <i>Bi-specific T-cell engager</i>
BTK	Inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton, del inglés, <i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CAR	Receptor de antígeno quimérico, del inglés, <i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	Antígenos de diferenciación, del inglés, <i>cluster of differentiation</i>
CEA	Antígeno carcinoembrionario, del inglés, <i>carcinoembryonic antigen</i>
CFDA	Departamento de administración de alimentos y medicamentos de China, del inglés, <i>China Food and Drug Administration Department</i>
CMV	Cítomegalovirus
SNC	Sistema nervioso central
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, del inglés, <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRS	Síndrome de liberación de citoquinas, del inglés, <i>Cytokine Release Syndrome</i>
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico, del inglés, <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño, del inglés, <i>Damage-associated molecular pattern</i>
DMEM	Medio <i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
Dox	Doxicilina
EAE	Enfermedad autoinflamatoria experimental
EICH	Enfermedad de Injerto contra huésped

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico, del inglés, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMA	Agencia europea del medicamento, del inglés, <i>European Medicine Agency</i>
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares, del inglés, <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FasL	Ligando de Fas
FBS	Suero fetal bovino, del inglés, <i>Fetal bovine serum</i>
FcRγ	Cadena γ del receptor Fc
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos, del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
GaLV	Virus de la leucemia del mono Gibón, del inglés, <i>Gibbon ape leukemia virus</i>
γRV	Vector Gammaretroviral
GFP	Proteína fluorescente verde, del inglés, <i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, del inglés, <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	Buenas prácticas de fabricación, del inglés, <i>Good manufacturing practice</i>
GOI	Gen de interés, del inglés, <i>Gene of interest</i>
HAMA	Anticuerpos anti-ratón humano, del inglés, <i>Human anti-mouse antibodies</i>
hESCs	Célula madre embrionaria humana, del inglés, <i>Human embryonic stem cell</i>
HLA	Antígeno leucocitario humano, del inglés, <i>Human leukocyte antigen</i>
HLH	Linfocitosis hemofagocítica, del inglés, <i>Hemophagocytic lymphohistiocytosis</i>
HMGB1	Proteínas de alta movilidad, del inglés, <i>High-mobility group box 1</i>
HSA	Albúmina de suero humano, del inglés, <i>Human serum albumin</i>
HSCs	Células madre hematopoyéticas, del inglés, <i>Hematopoietic stem cell</i>
HSV-1	Virus del herpes simple tipo 1, del inglés, <i>Herpes simplex virus type 1</i>
ICANS	Síndrome de neurotoxicidad asociado a células efectoras, del inglés <i>Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>
ICIs	Inhibidores de los puntos de control inmunológico, del inglés, <i>Immune checkpoints inhibitors</i>
ICOS	Coestimulador inducible de célula T, del inglés, <i>Inducible T-cell COStimulator</i>
IDIBAPS	Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer
IFNβ	Interferón β
IFNγ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible, del inglés, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IP3	Inositol trifosfato
ITAM	Inmunorreceptor con motivo de activación basado en tirosina, del inglés, <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
ITK	Tirosina quinasa inducible, del inglés, <i>Inducible tyrosine kinase</i>
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal, del inglés, <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KIR	Receptores tipo inmunoglobulinas de las células asesinas, del inglés, <i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LAG3	Gen 3 de activación del linfocito, del inglés, <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>

LAT	Enlace adaptador para la activación de células T, del inglés, <i>Linker for activation of T cells</i>
LCM	Leucemia Mieloide Crónica
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDCBG	Linfoma difuso de células B grande
LDL	Lipoproteína de baja densidad, del inglés, <i>Low density lipoprotein</i>
LF	Linfoma folicular
LF1-A	Antígeno 1 asociado a la función del linfocito, del inglés, <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LGC	Leucemia Granulocítica Crónica
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfática Crónica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LNH	Linfoma No-Hodgkin
LNH-B	Linfoma No-Hodgkin B
LOP	Lent-On-Plus
LTR	Repeticiones terminales largas, del inglés, <i>Long terminal repeats</i>
mAb	Anticuerpos monoclonales, del inglés, <i>monoclonar antibodies</i>
MAGE	Antígeno asociado al melanoma, del inglés, <i>Melanoma-associated antigen</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MART-1	Antígeno asociado a melanoma reconocido por células T, del inglés, <i>Melanoma-associated antigen recognized by T-cell</i>
MAS	Síndrome de activación de macrófagos, del inglés, <i>Macrophage-activation syndrome</i>
MCL	Linfoma de células del manto, del inglés, <i>Mantle cell lymphoma</i>
MDSCs	Células supresoras mieloides, del inglés, <i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLVT	Virus T de leucemia murina, del inglés, <i>Murine Leukemia Virus T</i>
MM	Mieloma Múltiple
MSCV	Virus de células madre murinas, del inglés, <i>Murine stem cell virus</i>
NCI	Instituto Nacional del Cáncer, del inglés, <i>National Cancer Institute</i>
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas, del inglés, <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Células asesinas naturales, del inglés, <i>Natural Killer cells</i>
Nluc	Nanoluciferasa
NT /NTD	No transducidas
NY-ESO-1	Carcinoma de células escamosas esofágicas de Nueva York, del inglés, <i>New York esophageal squamous cell carcinoma</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
P/S	Penicilina/Estreptomina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés, <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>

PBMC	Células mononucleares de sangre periférica, del inglés, <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PCL1γ	Fosfolipasa C γ 1, del inglés, <i>Phospholipase C γ1</i>
PD1	Proteína 1 de muerte celular programada, del inglés, <i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada, del inglés, <i>Programmed death-ligand 1</i>
PG2	Prostaglandina 2
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa, del inglés, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC	Proteína Quinasa C
PMBCL	Linfoma mediastínico de células B grandes, del inglés, <i>Primary mediastinal B-cell lymphoma</i>
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones, del inglés, <i>Pattern recognition receptor</i>
PSL	Ligando de fosfatidilserina, del inglés, <i>Phosphatidylserine ligand</i>
R/R	Recidivante/Refractario
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
scFV	Fragmento variable de cadena sencilla, del inglés, <i>Single-chain variable fragment</i>
SEHH	Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia
SFFV	<i>Spleen focus forming virus</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIN	Vectores lentivirales autoinactivables
SLAMF7	Miembro 7 de la familia de moléculas de activación de la señalización linfocítica, del inglés, <i>Signaling lymphocytic activation molecule family member 7</i>
SMAC	Conjunto de activación supramolecular, del inglés, <i>Supramolecular activation cluster</i>
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3, del inglés, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SUPRA-CAR	CAR programable, ajustable y universal, del inglés, <i>Split-universal-programmable CAR</i>
TAA	Antígeno asociado al tumor, del inglés, <i>Tumor associated antigen</i>
TALEN	Nucleasa de actividad similar al activador de transcripción, del inglés, <i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TAM	Macrófagos asociados al tumor, del inglés, <i>Tumor-associated macrophages</i>
T_{CM}	Célula T memoria central, del inglés, <i>T central memory cell</i>
TCR	Receptor de célula T, del inglés, <i>T cell receptor</i>
T_{EF}	Célula T efectora, del inglés, <i>T effector cell</i>
T_{EM}	Célula T efectora memoria, del inglés, <i>T effector memory cell</i>
Tet	Tetraciclina
Tfh	Célula T auxiliar folicular, del inglés, <i>T follicular helper cell</i>
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β , del inglés, <i>Transforming growth factor β</i>
Th	Célula T auxiliar, del inglés, <i>T helper cell</i>
TIGIT	Inmunorreceptor de célula T con inmunoglobulina y dominios ITIM, del inglés, <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIL	Linfocitos infiltrantes en el tumor, del inglés, <i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>
TIM3	Inmunoglobulina y proteína mucina 3 de células T
TLS	Síndrome de lisis tumoral, del inglés, <i>Tumor lysis syndrome</i>

TMB	Carga mutacional tumoral, del inglés, <i>Tumor mutational burden</i>
TME	Microambiente tumoral, del inglés, <i>Tumoral microenvironment</i>
TN	Células T naïve, del inglés, <i>T Naïve cell</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α , del inglés, <i>Tumoral necrosis factor α</i>
TNFR	Receptor de TNF, del inglés, <i>TNF receptor</i>
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
TRAG	Factores asociados a TNFR, del inglés, <i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF, del inglés, <i>TNF-related apoptosis-inducig ligand</i>
Tregs	Células T reguladoras
TRUCK	Del inglés, <i>T cell redirected for antigen-unrestricted cytokine initiating killing</i>
TSCM	Célula T madre troncal memoria, del inglés, <i>T stem cell memory</i>
iCAR	CAR inducible
uCAR	CAR universal, del inglés, <i>Universal CAR</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés, <i>vascular endotelial growth factor</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VLs	Vectores lentivirales
VP16	Proteína 16 del virus del herpes simple
VsVG	Glicoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular, del inglés, <i>Glycoprotein of the vesicular stomatitis virus</i>
WAS	Síndrome de Wiskott-Aldrich, del inglés, <i>Waskott-Aldrick Syndrome</i>
WT1	Antígeno 1 del tumor de Wilms, del inglés, <i>Wilms' tumor Antigen 1</i>
ZFNs	Nucleasas de dedos de Zinc, del inglés, <i>Zinc-finger nucleases</i>
ZIP	Cremallera de leucina, del inglés, <i>Leucine zipper</i>

INTRODUCCIÓN

1 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE LINAJE B

El término “cáncer” engloba a todos los tipos de tumores malignos siendo desafortunadamente la primera o segunda causa de muerte en países cada vez más envejecidos según la Organización Mundial de la salud (OMS, 2020) y constituye la primera causa de mortalidad en pacientes pediátricos, especialmente la leucemia. Se estiman que 10 millones de personas han fallecido por alguno de los diferentes tipos de cáncer en 2020 y se han diagnosticado más de 18 millones de nuevos casos (GLOBOCAN 2020, Sung *et al.*, 2021).

A lo largo de los años, la investigación contra el cáncer ha intentado comprender los diversos y complejos mecanismos intrínsecos de cada tumor y sus mecanismos de escape asociados, que no dejan de evolucionar. Sin embargo, sólo unas pocas estrategias consiguen mejorar significativamente la vida de los pacientes por lo que existe una continua necesidad de avanzar tanto en investigación básica como en novedosos tratamientos versátiles y más seguros que permitan solventar cualquier nuevo mecanismo de escape.

Hasta hace unas décadas, el tratamiento *convencional* ha incluido estrategias como la quimioterapia (Savage, 2016), radioterapia (FitzGerald *et al.*, 2019) y resección por cirugía (Sullivan *et al.*, 2015) como primera línea de tratamiento que, si bien han resultado efectivos, presentan muchos efectos secundarios. La quimioterapia emplea agentes citotóxicos que impactan sobre las células en división, afectando así no sólo a las células malignizadas, sino también a las células epiteliales del intestino, precursores hematopoyéticos y el folículo piloso, entre otros. La cirugía, generalmente es empleada para tumores operables primarios, siendo inútil cuando hay metástasis. La radioterapia utiliza altas dosis de radiación para inducir daños en el ADN, a menudo empleada sobre tumores primarios, o como previo paso a la cirugía o quimioterapia, donde las células sanas adyacentes se ven afectadas de la misma manera.

La inmunoterapia es un área que ha ido evolucionando en los últimos 30 años, proporcionando diferentes enfoques muy potentes y prometedores para diferentes enfermedades, especialmente contra el cáncer (Aranda *et al.*, 2019). La inmunoterapia antitumoral o inmunooncología, laureada con un premio Nobel en 2018 gracias al trabajo de los inmunólogos James P. Allison y Tasuku Honjo por su descubrimiento de los inhibidores de punto de control inmunológico (ICIs del inglés, *immune check-points*) como tratamiento para el cáncer, constituye a día de hoy un nuevo pilar con identidad propia (He and Xu, 2020).

Las neoplasias hematológicas forman un grupo de enfermedades heterogéneas que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas, que afectan a sangre periférica y médula ósea (tradicionalmente conocidas como leucemias) u a órganos linfoides secundarios (linfomas), con un desarrollo agudo o crónico (más lento), dependiendo del tipo celular y estadio

de diferenciación. Las leucemias ocupan la primera causa de muerte a nivel mundial en población menor de 40 años, con una incidencia del 14.7% de las muertes en 2020, seguida en quinta posición por los linfomas de tipo no-Hodgkin (6%). (Figura 1, GLOBOCAN, 2020).

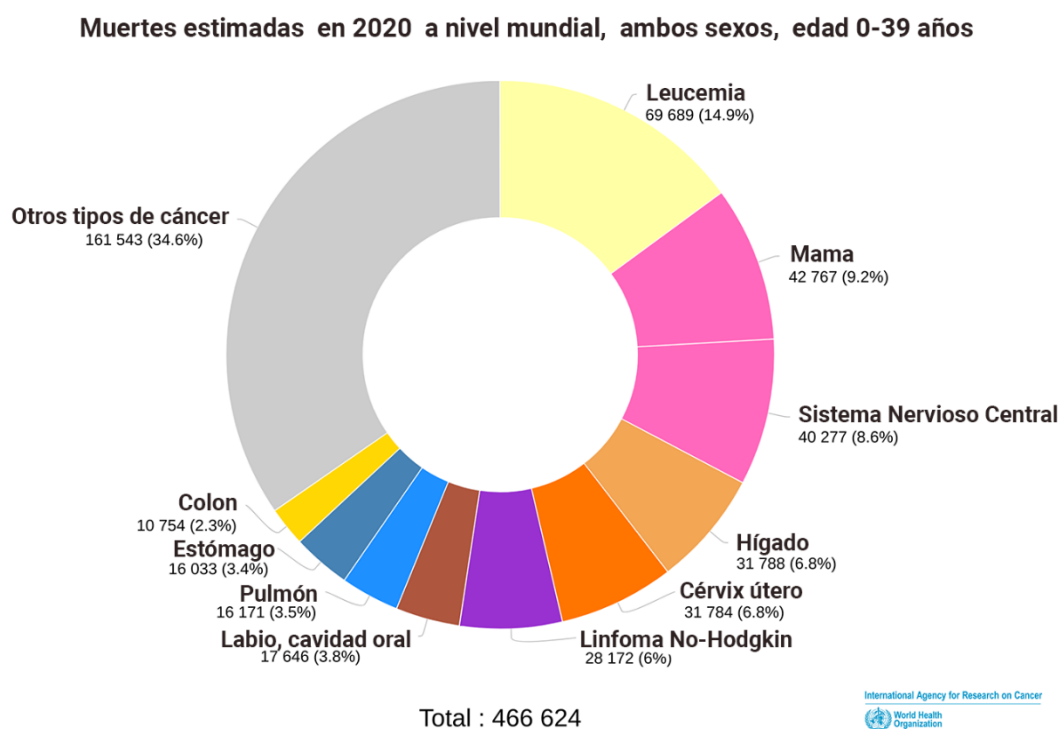


Figura 1. Número de muertes por cáncer en 2020 a nivel mundial en ambos sexos en la población menor de 40 años. Datos de GLOBOCAN, 2020, de la Organización Mundial de la Salud.

A diferencia del tumor sólido, donde los linfocitos que infiltran el tumor están confinados en tejido localizado, la leucemia diseminada implica un contacto continuo y sistémico entre el clon del tumor y el sistema inmunológico (Dong and Ghobrial, 2019a). Además, las células tumorales pueden “secuestrar” los nichos que pertenecen al desarrollo normal de las células inmunitarias, como ocurre en la médula ósea, y provocar una disfunción inmunológica grave.

Actualmente, la OMS ha clasificado los tumores hematológicos en mieloides y linfoides, y dentro de estos últimos, destacamos los precursores de tipo B, células B maduras y linfomas de Hodgkin. Las neoplasias de células B son tumores de alta prevalencia que proceden de la transformación de linfocitos B en diferentes estadios de su diferenciación. Incluyen el cáncer pediátrico más frecuente, la Leucemia Linfoblástica Aguda B (LLA-B), así como Linfomas No-Hodgkin B (LNH), la Leucemia Linfática Crónica (LLC) y el mieloma múltiple (MM). En cuanto a la prevalencia, se estima que en España podría haber 23.000 pacientes con algún tipo de linfoma, 16.000 con alguna leucemia y cerca de 6.000 con mieloma múltiple, según datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) (Marcos-Gragera, no date).

1.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA-B

La Leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) es una neoplasia hematológica de carácter heterogéneo con un clon de precursores linfoides inmaduros proliferante en médula, sangre periférica y en otros órganos, afectando al desarrollo normal de la hematopoyesis, llegando a la muerte si no se trata (AEMPS, 2017). La mayoría de las LLA de célula B expresan el antígeno CD19, un 20-40 % el CD20 y un 70% el CD22 (DeAngelo, 2015).

La LLA-B es el segundo cáncer más común en la infancia y afecta al estadio de diferenciación de la célula Pre-B. Presenta una incidencia de 1,7 casos por cada 100.000 habitantes, distribuido de manera bimodal, con un primer pico del 60% de los casos en menores de 20 años y un segundo pico en mayores 60 años. Con un tratamiento adecuado se consigue la curación en el 80% de los niños, y el 35% de los adultos, presentando un 15-20% de recaídas, siendo mayor en los grupos de alto riesgo (25-30%). Se estima que 10-15% de los pacientes son resistentes a los tratamientos de poliquimioterapia actuales. En estos casos de LLA-B recidivante/refractarios (R/R), se realiza una quimioterapia denominada de rescate seguida de alo-trasplante de progenitores hematopoyéticos, siendo la única opción potencialmente curativa con supervivencia global a los 5 años en torno al 20-45%. (AEMPS, 2017). Finalmente, cuando los pacientes recaen después de esta segunda línea de tratamiento, no existen tratamientos estándar y el pronóstico suele ser muy grave.

Los tratamientos de inmunoterapia actuales aprobados para los pacientes adultos con LLA-R/R, poseen una mediana de supervivencia de 7.7 meses, lo que pone de manifiesto la necesidad urgente de nuevos tratamientos (SEHH, 2020).

1.2 LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en el mundo occidental, con mayor incidencia en varones y afecta a las células B maduras (**Figura 2**). La LLC constituye el 30% de las leucemias en adulto, con una incidencia de 4-5 casos cada 100.000 habitantes y año y que se incrementa hasta 30 casos por 100 000 habitantes en población mayor de 80 años (AEMPS IPT4/2020, 2020).

Se trata de una enfermedad aún incurable, en la que, a día de hoy, se realizan diferentes tratamientos dependiendo de la infiltración tumoral, así como según las mutaciones detectadas. Efectivamente, la quimioterapia está siendo desplazada por la administración oral de pequeñas moléculas inhibitoras en monoterapia o junto a anticuerpos monoclonales, tanto como primera línea de tratamiento como para recaídas. La mayor parte de estos fármacos van dirigidos a contrarrestar mecanismos que han desarrollado los diferentes subtipos de LLC para proliferar, sobrevivir y/o bloquear la respuesta inmune, con unos efectos secundarios pueden llegar a ser

muy severos e incluso causar la muerte de los pacientes (AEMPS IPT4/2020, 2020). Este tratamiento también estará determinado por la presencia de diferentes mutaciones (como las de IgVH) o alteraciones citogenéticas (delección del 17p del gen TP53, entre otras) que pueden estar asociadas a un peor pronóstico o agresividad de la enfermedad. Además, hay que tener en cuenta que durante el tratamiento (por causa directa o por causa ajena al mismo), la LLC puede transformarse en un linfoma no Hodgkin de mayor grado y hasta un 10% de los casos de LLC se convierten en linfoma difuso de células B grandes.

En resumen, aunque las opciones terapéuticas para el tratamiento de LLC se han ampliado con la medicina personalizada en función del tipo de mutación/es (ver **tabla 4**), sigue siendo evidente la necesidad de reducir los efectos secundarios e incrementar la eficacia terapéutica para tratar aquellos LLC que cursan agresivos, recidivantes y refractarios.

1.3 LINFOMA DE HODGKIN

El linfoma de Hodgkin (LH) es un linfoma de células B caracterizado por una peculiar composición celular que incluye menos del 1% de células tumorales (células Reed-Sternberg y sus variantes) junto con una población de células no-tumorales inflamatorias muy diversas y supone el 10% de todos los linfomas. La incidencia y mortalidad en la Unión Europea se estima en 2,2 y una mortalidad de 0,7 individuos/100.000 habitantes y año, respectivamente. La incidencia de la enfermedad sigue una distribución bimodal, con un primer pico entre los 15 y 30 años y un segundo pico después de los 50 años (SEHH-FEHH, 2020).

Dentro de las neoplasias hematológicas de tipo B, es la que mayor tasa de éxito terapéutico tiene mediante tratamiento con quimioterapia. Sin embargo, el 5-10% de los pacientes tendrá enfermedad refractaria a la terapia de primera línea y el 10-30% recaerá (Voorhees and Beaven, 2020). Tras el R/R, se realiza una quimioterapia de rescate seguida de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, con una supervivencia histórica de 26 meses. Afortunadamente, en los últimos tiempos nuevos tratamientos, que incluyen pequeñas moléculas inhibidoras y anticuerpos monoclonales anti-PD-1, han conseguido incrementar la supervivencia en LH R/R.

1.4 LINFOMAS NO-HODGKIN

Los linfomas No-Hodgkin es un grupo muy heterogéneo que está dividido en más de 30 tipos donde el 85% son del tipo B y suponen un 2.9% de todos los cánceres de España en 2020 (SEHH-FEHH, 2020). También se pueden clasificar como agresivos (de rápido crecimiento) o indolentes.

Dentro de los LNH-B, con una incidencia de 20 casos por cada 100.000 habitantes, podemos encontrar; linfoma difuso de células B grandes (LDCBG, el más común de los linfomas, suponiendo el 30-35% de todos los casos y de desarrollo agresivo); linfoma folicular (FL, 20-25%, indolente); el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (7-10%, indolente); el linfoma linfocítico pequeño o leucemia linfocítica crónica (6-8%); el linfoma de células del manto (MCL, 5-7%, agresivo); linfoma primario asociado a sistema nervioso central (CNS, 5%); el linfoma de Burkitt (2-3%, aunque poco frecuente es siendo el tipo más agresivo); el linfoma mediastínico de células B grandes (PMBCL, 2-3%) y otros subtipos minoritarios

A pesar de considerarse el LNH como una neoplasia maligna potencialmente curable con una tasa de supervivencia a los 5 años del 60%, aproximadamente del 20% al 30% recaen o son refractarios a la terapia de primera línea (Redondo y Martínez, 2019). El tratamiento estándar actual para LDCBG es la combinación quimioterapia junto con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (SEHH-FEHH 2020). Tras la R/R, se aplica quimioterapia de rescate seguida de autotransplante de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH). Sin embargo, el 40-50% de los pacientes no son elegibles para auto-TPH debido a quimio-refractoriedad o comorbilidades subyacentes. De los que finalmente se trasplantan, el 50-60% recaen, por lo que quedarían muy pocas opciones, incluyendo el alo-TPH, que solo es factible en una minoría de pacientes sin resultados excesivamente buenos (Gisselbrecht and Van Den Neste, 2018). Tampoco existe ningún tratamiento estándar para los pacientes con LDCBG R/R tras dos o más líneas de tratamiento, con una supervivencia global de 6 meses.

Respecto al linfoma de células del manto (LCM), la combinación de poliquimio-inmunoterapia genera un índice de respuestas completas oscila entre el 40% y el 90%, pero la mediana de la supervivencia global en los casos refractarios/recidivantes es de sólo 1 a 2 años, por lo que también manifiesta una necesidad en la mejora de los tratamientos (AEMP IPT, 12/2017).

1.5 MIELOMA MÚLTIPLE

Es una neoplasia frecuente de células plasmáticas que proliferan e invaden la médula ósea, representando el 10% de las neoplasias hematológicas, y el 1% de todas las neoplasias. Su incidencia también se incrementa con la edad, pasando de un 2 por 100.000 por debajo de los 50 años, a un 20-25 por 100.000 en la década de los 70 años. La edad media al diagnóstico se sitúa por encima de los 60 años (IPT, 35/2019. V1, AEMPS).

Actualmente, sólo el 35% de los pacientes tratados con quimioterapia y trasplante autólogo a muy largo plazo (20-30 años) han presentado curación total. Afortunadamente, gracias a los nuevos tratamientos la calidad y esperanza de vida ha mejorado gracias a las nuevas terapias

como los inhibidores del proteasoma, fármacos inmunomoduladores anticuerpos monoclonales e inhibidores de histona deacetilasa (IPT, 35/2019. V1, AEMPS).

Si bien estas nuevas terapias han llevado a un mejor control de la enfermedad, el mieloma sigue siendo en muchos casos incurable y los pacientes de alto riesgo no se benefician mucho de este arsenal de terapias. La resistencia a los medicamentos es inevitable y la recaída de la enfermedad sigue siendo un gran desafío clínico.

En definitiva, las neoplasias de células B son tumores de alta prevalencia y aunque la mayoría de las LAL-B y las LNH-B son curables (entre un 60 y un 85%), cuando no hay respuesta o se produce una recaída tras el tratamiento, las opciones de supervivencia se reducen drásticamente. Por el contrario, las LLC-B se consideran incurables, aunque son de curso más prolongado y por tanto, mayor exposición a las toxicidades de los tratamientos. En general, se estima que hasta un 30% de los pacientes diagnosticados con neoplasias B desarrollarán resistencia a los tratamientos y se evidencia la necesidad de una generación de nuevas líneas de tratamiento eficaces y en la búsqueda de efectos secundarios menores.

1.6 DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS B: DIANAS TERAPÉUTICAS

Las células B se originan y maduran en la médula ósea, mientras que se activan en los órganos linfoides secundarios. En el proceso de malignización y dependiendo del estadio de diferenciación en el que se encuentre esa célula B, se desarrolla el tipo de tumor hematológico, el cual se puede determinar por un inmunofenotipo de moléculas en superficie.

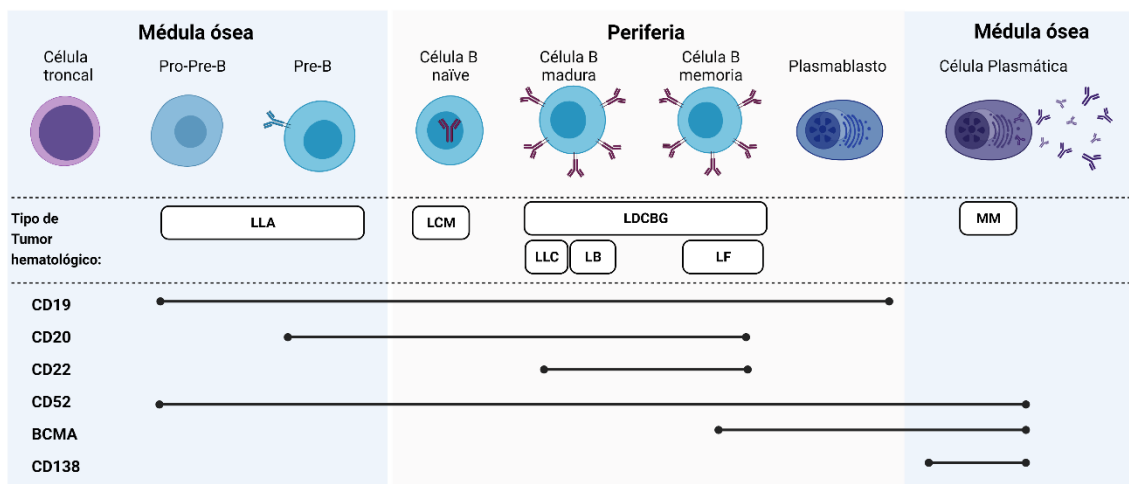


Figura 2. Estadios de diferenciación asociados a los principales tumores hematológicos de linaje B y expresión de algunos marcadores de superficie. LLA: leucemia linfoblástica aguda. LCM: linfoma de células del manto. LLC: leucemia linfática crónica. LB: linfoma de Burkitt. LDCGB. Linfoma de células B grandes. MM: mieloma múltiple.

De una manera muy general, la célula progenitora (CD34+) se diferencia hacia Pro-B adquiriendo CD10 y CD19. CD19 es una glicoproteína de membrana (95kDa) de tipo I de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), con expresión restringida a las células B, e involucrada en el destino y la diferenciación de las células B a través de la señalización del receptor de las células B (BCR) en múltiples etapas del desarrollo de las células B desde estado de pre-B y que estará homogéneamente expresada hasta se va perdiendo en la célula plasmática. En el siguiente estadio desde pre-B, adquiere CD20, con una densidad mayor que CD19, pero perdiéndose en el paso a célula B memoria. CD21 y CD22 también son específicos de células B (Walker *et al.*, 2017).

El patrón de expresión de CD19 parece mantenerse en las neoplasias malignas de células B, aunque con matices en su densidad antigénica. Así, salvo excepciones, la expresión de CD19 se mantiene alta LLA-B tras el diagnóstico y parece variar entre los diversos tipos de linfomas. Mientras que las muestras de CLL demostraron consistentemente niveles de expresión de CD19 que se aproximaban a los observados en células B normales, las muestras de LDCBG, LCM y LF demostraron niveles medios de CD19 significativamente más bajos, con la mayor variabilidad entre pacientes observada para LDCBG (Majzner *et al.*, 2020).

2 SISTEMA INMUNOLÓGICO Y LAS CÉLULAS T

2.1 EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA IMPORTANCIA DE LA INMUNO-VIGILANCIA FRENTE AL CÁNCER

En 1909, Paul Ehrlich ya razonó lo que a día de hoy es un hecho y es que la incidencia del cáncer es relativamente baja pero que la formación de células aberrantes es un fenómeno común, sugiriendo así la existencia de sistema de defensa frente a las células tumorales. Más de 50 años después, estas ideas fueron desarrolladas por Burnet y Thomas, que acuñaron formalmente la hipótesis de la "vigilancia inmunológica", donde se pone de manifiesto que el sistema inmunológico juega un papel importante, en el desarrollo y control neoplásico, ya que los pacientes inmunosuprimidos tienen un mayor riesgo de cáncer (Dunn *et al.*, 2002; Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

El sistema inmunitario se define según la Sociedad Española de Inmunología como *un sistema complejo de células y factores solubles que trabajan de forma coordinada para mantener la integridad de nuestro organismo*. El mantenimiento de la integridad del organismo incluye la defensa contra patógenos, la vigilancia antitumoral, y las respuestas frente a diferentes señales de peligro físicas o biológicas, endógenas o exógenas.

En la respuesta inmunológica, podemos diferenciar una primera línea de acción, el sistema innato que actúa desde minutos a días, aportando una respuesta inmediata; y posteriormente, se generarían respuestas del sistema inmunitario adaptativo. A nivel celular, podemos encontrar células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células dendríticas, células asesinas naturales o *natural killer* (NK), basófilos y eosinófilos dentro del sistema celular innato; y linfocitos T colaboradores CD4+ y citotóxicos CD8+; y linfocitos B como productores de una respuesta humoral, como componentes principales de la respuesta adaptativa. Todos estos tipos celulares ejecutarán una respuesta concreta, orquestando así un efecto coordinado a través de diferentes moléculas, órganos y tejidos (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

A pesar de que el sistema inmunitario es tremendamente eficaz reconociendo patógenos extraños, posee mecanismos para evitar reaccionar a las células propias y evitar enfermedades de carácter autoinmune. Las células tumorales pueden generar neoantígenos (antígenos normalmente citosólicos o nucleares generados por mutaciones como p53) que tienen el potencial de ser inmunogénicos y exclusivos del tumor. En la misma línea, ciertos virus (como el de Epstein-Barr, Papiloma humano, MLVT) tienen capacidad oncogénica por lo que antígenos virales son capaces de desencadenar una respuesta específica. Sin embargo, en muchos casos, los antígenos asociados al tumor (TAA) son antígenos de células normales (Her2/Neu), restringidos a ciertos órganos o tipo celular (NY-ESO, MAGE) o de origen fetal (CEA, α -fetoproteína) que se encuentran

sobreexpresados en células tumorales, por lo que muchos de estos autoantígenos no generarán una respuesta inmunológica funcional. En aquellos casos en los que los antígenos tumorales son reconocidos, las células transformadas pueden ser eliminadas. Sin embargo, en ocasiones el tumor progresa a pesar de la presencia de estos antígenos tumorales debido a la *inmunoedición* directa del tumor, la supresión de las células inmunitarias y un microambiente tumoral muy inhibitorio y de difícil acceso (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

La inmunoedición se puede definir como el proceso dinámico que ocurre durante la inmunovigilancia inmunitaria y la progresión tumoral (Dunn *et al.*, 2002). La presión selectiva continua ejercida por el sistema inmunitario sobre las células tumorales, conduce a éstas a desarrollar mecanismos que les permiten escapar de la inmunovigilancia o inhibir la actividad de las células inmunitarias. Se describen formalmente tres fases: eliminación, equilibrio y escape (revisadas en O'Donnell, Teng and Smyth, 2019).

En la fase de eliminación se destaca el daño inicial y papel del sistema innato. Los tumores secretan moléculas proinflamatorias que reclutan a células infiltrantes como las células NK, las cuales van a inducir la apoptosis o lisis tumoral a través de IFN γ y secretando perforinas. Así se expone los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y antígenos tumorales, que van a amplificar la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, reclutando al lecho tumoral células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos). Estas células capturarán los antígenos tumorales para presentarlo a células T naïve a través del complejo de histocompatibilidad (MHC) de tipo I y II, generando así células citotóxicas CD8 y colaboradoras CD4 específicas del tumor, respectivamente. Estas células T citotóxicas migrarán de los ganglios linfáticos en respuesta a la señalización por quimioquinas, y junto a las células NK, ayudarán a la destrucción del tumor, liberando de nuevo neoantígenos al medio, que pueden ayudar a generar una respuesta secundaria. Los linfocitos del tumor pueden volver a ser estimulados por las células dendríticas presentes en el TME o bien directamente por a través del MHC (O'Donnell, Teng and Smyth, 2019).

La fase de equilibrio aparece cuando no hay una eliminación tumoral completa, progresan, y el sistema inmunitario continúa eliminándolas durante un periodo de tiempo. Es en esta fase de equilibrio donde las células tumorales adquieren nuevas mutaciones y/o comportamientos que les permiten hacerse resistentes al ataque continuado del sistema inmunitario

En la fase de escape, las células tumorales terminan por desarrollar estrategias que permiten sortear el control de las células inmunitarias, como puede ser regular a la baja antígenos asociados al tumor (neoantígenos), pérdida de expresión de MHC-clase I o β 2-microglobulina

(β 2M) (por lo que no pueden ser reconocidos por los linfocitos citotóxicos) o generar un microambiente tumoral muy inmunosupresor mediante la sobreexpresión de moléculas de punto de control inmunológico (como CTLA-4, PD1 y PD-L1) que impide actuar a las células T citotóxicas, entre otros mecanismos. Las células tumorales que dejan de presentar MHC-clase I en su membrana, a priori, deberían ser más susceptibles de ser reconocidas por células NK, pero se han descrito diferentes mecanismos que bloquean la activación de estas células, como por ejemplo mutaciones en los receptores que activadores, o la expresión aberrante de moléculas no clásicas de HLA-G o HLA-E (Dhatchinamoorthy, Colbert and Rock, 2021).

Además de todos estos mecanismos descritos, el tumor termina por convertir en aliado a diferentes elementos del sistema inmunitario, que ahora favorecerán el crecimiento del tumor. Por ejemplo inducen (a través de factores inmunosupresores como TGF- β , VEGF, IL-6, PG2 o IL-10 entre muchas otras) a las células inmunes presentes en el tumor a promover la expansión, activación y migración de ciertos tipos de células reguladoras capaces de suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral, tales como linfocitos T reguladores (Tregs), células supresoras mieloides (MDSCs), macrófagos asociados al tumor (TAM) y distintos subtipos de células dendríticas maduras e inmaduras (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

2.2 LINFOCITOS T Y SU PAPEL ANTITUMORAL

El linfocito T es un eje central del sistema inmunitario frente a la lucha contra el cáncer, por su capacidad citotóxica dirigida a una diana concreta, y que, además, se ha convertido en el protagonista de diversas estrategias de inmunoterapia celular-génica. En este apartado describiremos de manera general los aspectos fundamentales de las células T y su función antitumoral.

Los linfocitos T y B fueron caracterizados en la década de 1960, hecho reconocido por el Premio Lasker de Ciencia Básica 2019, otorgado por el trabajo pionero de Jacques Miller y Max Dale Cooper que definió los roles clave de las células T y las células B en la inmunidad adaptativa (Aranda *et al.*, 2019). Los linfocitos B reconocen el antígeno circulante en su forma nativa y responden secretando anticuerpos específicos contra él. Las células T reconocen antígenos peptídicos, derivados de proteínas degradadas intracelularmente, que se cargan en las moléculas MHC de la superficie celular de las células presentadoras de antígeno (APC), un proceso llamado *presentación de antígenos* (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

El **MHC**, con su péptido cargado, va a interactuar con el receptor principal de la célula T (TCR), un complejo de proteínas específico de un clon único de células T, que reconoce específicamente los antígenos presentados en MHC y participa en el proceso de selección del desarrollo de los diferentes clones.

El **TCR** está formado por cadenas de glicoproteínas α y β únicas altamente polimórficas (una pequeña población de células T alberga cadenas γ y δ) que contienen regiones variables y constantes, similares a las inmunoglobulinas, y un grupo de cadenas de señalización no polimórficas llamados CD3 γ , δ , ϵ y ζ . Además, presentan una molécula correceptora CD4 o CD8, que definen a dos subclases funcionales amplias de linfocitos CD4 colaboradores o CD8 citotóxicos y que facilitan la señalización intracelular tras la activación del TCR (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018). Los primeros sólo detectan el antígeno en el contexto de las moléculas del MHC de clase II y colaboran con las células B para la generación de una respuesta humoral quimiotáctica, proinflamatoria e inmunoprotectora. Por otro lado, los linfocitos citotóxicos CD8 detectan el antígeno en el contexto de las moléculas del MHC de clase I y llevan a cabo reacciones citotóxicas directas que destruyen las células infectadas o neoplásicas. Las células CD4 o *colaboradoras* se diferencian a diferentes subtipos Th (del inglés, *T helper*) que se pueden clasificar según el perfil de citoquinas que secreten. Podemos encontrar: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg (células T reguladoras) y Tfh (células T auxiliares foliculares) (Golubovskaya and Wu, 2016).

2.2.1 Clasificación de las células T en función de su estadio de diferenciación

Además de la clasificación de las células T descritas anteriormente, podemos distinguir diferentes poblaciones atendiendo a su grado de diferenciación, proliferación, capacidad para migrar específicamente a los sitios tumorales, proliferar y ejercer función efectora para destruir células tumorales, siendo de especial relevancia para definir las mejores poblaciones de aplicación en inmunoterapia.

Hoy en día sabemos que la calidad, eficacia y longevidad de las células T son el resultado de la diversificación de las células T naïve (T_N), tanto CD4 y CD8, en subtipos fenotípica y funcionalmente diferentes tras el primer encuentro antigénico (Fig. 3), entre los que encontramos las células T troncales memoria (T_{SCM} , del inglés *stem cell memory*), memoria central (T_{CM} , *central memory*), memoria efectoras (T_{EM} , *effector memory*), las efectoras (T_{EF} , *effectors*) finales antes de morir por apoptosis (Gattinoni *et al.*, 2011; Golubovskaya and Wu, 2016).

Durante este complejo proceso de diferenciación, las células T sufren diferentes modificaciones en su capacidad de proliferación, metabolismo, capacidad de infiltración o migración (*homing*) y, tanto de su funcionalidad, lo que se traslada a la expresión de diferentes marcadores de superficie que permiten identificarlas (**Figura 3**):

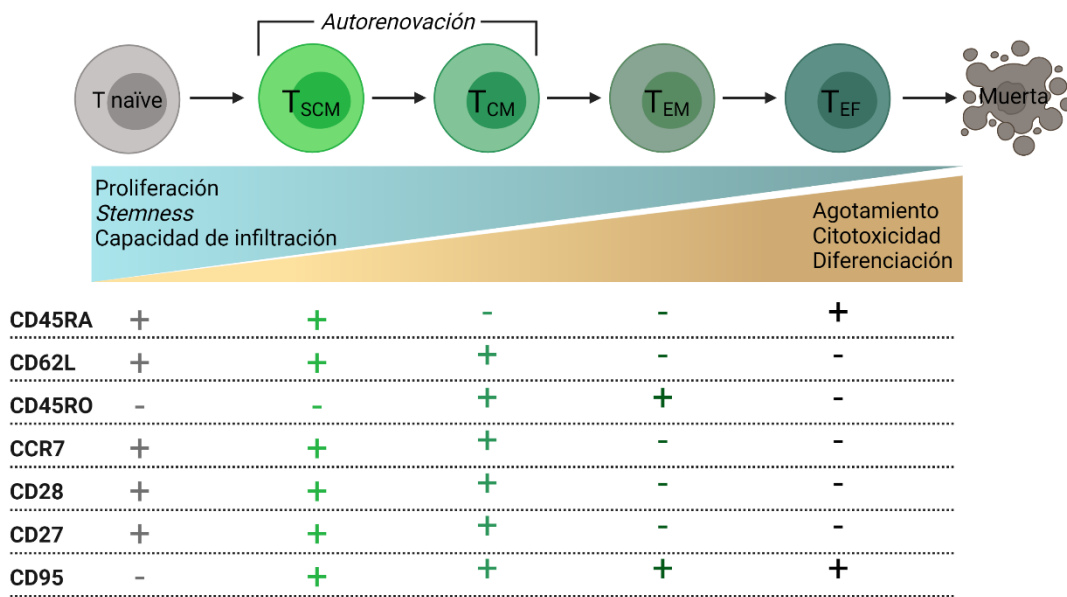


Figura 3. Características fenotípicas y funcionales de los diferentes estadios de diferenciación de las células T post-tímica.

Las células T naïve maduras tras la selección clonal positiva y negativa en el timo, salen a sangre periférica, cuya característica es que no han reconocido aún ningún antígeno. Estas células T naïve tras una estimulación antigénica genera su diferenciación hacia las diferentes subpoblaciones descritas.

La población de células humanas T_{SCM} fue descrita por primera vez en 2011 (Gattinoni *et al.*, 2011), como una población memoria con capacidad de autorrenovación y multipotencia superior a las células T memoria central, y que se encuentra en un porcentaje muy bajo en la sangre periférica. Ambas poblaciones de células T_{SCM} y T_{CM} expresan el receptor de quimioquinas CCR7 y la molécula de adhesión CD62L (L-selectina) para infiltrarse en los nódulos linfáticos. A pesar de tener menor capacidad efectora, ambas presentan una alta capacidad de proliferar y generar células efectoras rápidamente tras la exposición al antígeno, lo que las hace especialmente interesantes para una mayor eficacia terapéutica.

Por el contrario, las células efectoras memoria y efectoras no expresan CCR7 o CD62L por lo que su migración es más hacia la periferia que hacia los ganglios linfáticos, producen citoquinas proinflamatorias y tienen una vida media más corta dado que están terminalmente diferenciados (Golubovskaya and Wu, 2016).

2.2.2 Señales en la activación del linfocito T

Tras la activación a través del TCR, las células T en reposo se activan y proliferan como resultado de la combinación de estimulación antigénica (señal 1), coestimulación (señal 2) y

factores de crecimientos autocrinos y paracrinos (como IL-2, IL-7 entre otras) (señal 3) (Chen and Flies, 2013).

La primera señal (señal 1) recibida por una célula T_N es la que se genera de la interacción entre el TCR específico de antígeno con un péptido antigénico presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). El segundo conjunto de señales (señal 2) se genera a través de moléculas de co-señalización que se expresan en la superficie celular de las APC. La señal 2 de los receptores coestimuladores y co-inhibidores tiene un papel fundamental en la biología de las células T, ya que determinan el resultado funcional de la señalización del receptor de las células T (TCR). Efectivamente, señales positivas (receptores coestimuladores como CD28 y 41BB) o negativas (receptores co-inhibidores) modulan la señalización de TCR, que, junto con la señal 3 de las citocinas existentes en el entorno terminan por matizar la respuesta de esta interacción, no solo en cuanto a la función efectora, sino también en cuanto a su diferenciación hacia diferentes subpoblaciones de células T y a la supervivencia (**Figura 4**), y ejerciendo su capacidad lítica directa a través de la secreción de granzima y perforina, que generarán poros en la célula diana así como una inducción de la apoptosis a través de Fas/FasL; mientras que por otro lado, serán capaces de secretar citoquinas y quimiocinas, para reclutar al resto del sistema inmunitario en una respuesta coordinada (**Figura 5**).

Co-receptores estimuladores e inhibidores

El repertorio de receptores de co-señalización expresados en las células T es muy versátil y capaz de responder de manera diferente frente a los cambios en el entorno tisular. Diferentes tejidos y estados fisiológicos expresan diferentes tipos de ligandos y *contra-receptores* de co-señalización que modulan de forma diferente la respuesta T. Por ejemplo, se sabe que en los tumores, la activación de co-receptores como PD1 y CTLA-4 bloquea una respuesta efectiva de las células T, abriendo posibilidades de intervención mediante inmunoterapia bloqueando estas señalizaciones (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

Co-receptores estimuladores

Familia de co-receptores CD28. La proteína de superficie no polimórfica CD28 y los miembros de su familia son los co-receptores estimuladores más potentes en las células T y se unen a sus ligandos CD80 y CD86 de las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *antigen presenting cell*) y se regulan positivamente tras la activación de los *Toll-like receptor* tras reconocer patrones moleculares asociados a daño molecular o patógenos (DAMPs o PAMPs, respectivamente) o con otras citoquinas como IFN γ . Además, las propias células CD4+ pueden regular positivamente la expresión de moléculas CD80/86 en las células APC, a través de la interacción de CD40L:CD40. Otra molécula de la familia de CD28 es ICOS (coestimulador

inducible, CD278), la cual está menos estudiada y parece tener mayor importancia en el subtipo de TH2 (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

Superfamilia de co-receptores de TNF (TNFR)

En esta familia de co-receptores se encuentran CD40L, OX40 (CD134), 41BB (CD137) y CD27 entre otros. CD40L es una molécula expresada en las células T tras 24-48h tras la activación e interacciona con CD40 expresado en las células APC, favoreciendo la cascada de activación y promoviendo la secreción de citoquinas como IL-2 por parte de las APCs (**Fig. 4**).

OX40, expresado en células activadas CD4+ y CD8 es necesaria para mantener la supervivencia y respuesta sostenidas mientras. En cuanto a 41BB, se sabe que aporta una de las señales más importante en las células T CD8 que ya han reconocido antígeno, mediando su expansión y la adquisición de la función efectora (Maus *et al.*, 2002).

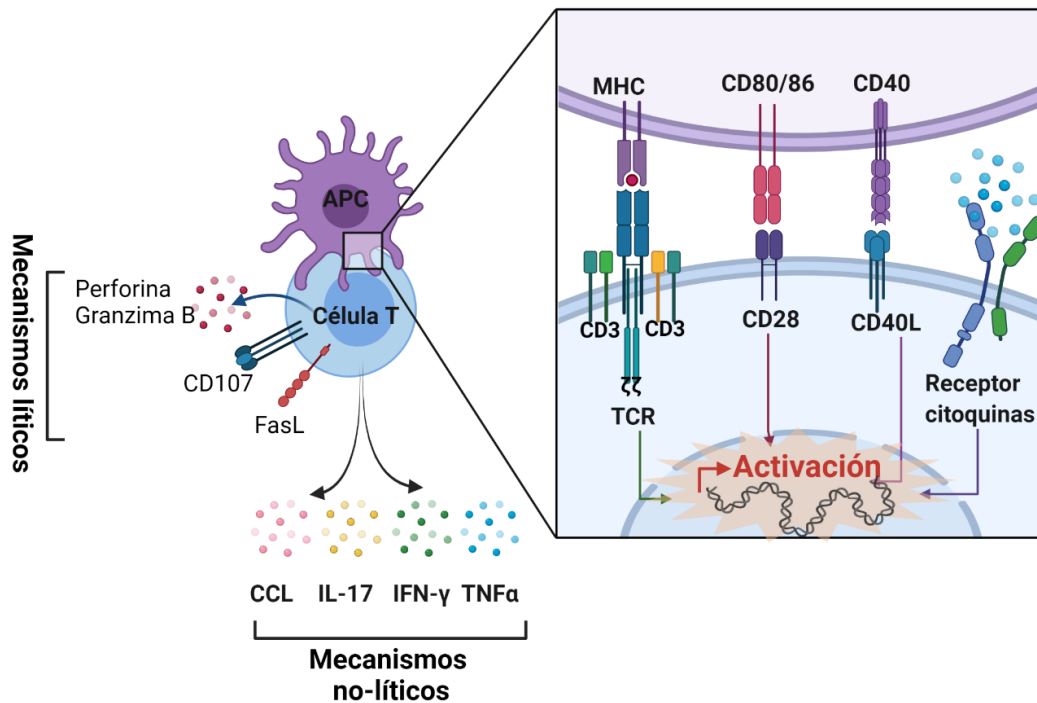


Figura 4. Representación esquemática de la activación de la célula T que conllevan a mecanismos con actividad lítica directa o no lítica. Tras la unión del TCR al MHC de la célula presentadora (APC) en este caso, la segunda señal vía CD28-CD80/86 promueve la activación eficiente. Posteriormente, ese estado de activación y proliferación se ve favorecido por la señalización dada por CD40L y los receptores de diferentes citoquinas. Todo ello puede promover la secreción de citoquinas y quimioquinas para favorecer un ambiente proinflamatorio que recluten a otros miembros del sistema inmunitario y por otro lado, pueden expresar FasL para desencadenar apoptosis en la célula diana, y secretar proteínas líticas como perforina y Granzima B, y con ello, presentado además en membrana el marcador de degranulación CD107a.

2.2.3 Co-receptores inhibidores

De forma global, los receptores inhibidores representan un "punto de control" para determinar dónde, cuándo y por cuánto tiempo han de responder las células T. Muchos de estos receptores son inducibles tras la activación inicial de las células T con la misión de frenar la actividad iniciada y reestablecer la homeostasis, evitando la hiperactivación (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

Dentro de la familia de CD28, podemos encontrar dos de las proteínas inhibidoras más importantes en definir la respuesta T: la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína de muerte programada 1 (PD-1). CTLA-4 es un inhibidor competitivo de CD28, uniéndose incluso con más fuerza a los receptores CD80/CD86, principalmente para inhibir la activación de los linfocitos T en órganos linfoides secundarios. Por otro lado, PD-1 interacciona con PD-L1 e inhibe principalmente a las células T efectoras en periferia.

Otros receptores inhibidores son: 1) LAG-3, marcador de agotamiento que reduce la activación de las células T al bloquear los sitios de contacto de CD4 en las proteínas del MHC de clase II y que se expresa en las células T activadas y las células Treg; 2) TIM3, otro marcador de agotamiento que promueve el desarrollo de células T efectoras de vida corta. Se han descrito cuatro ligandos para TIM3: Galectina 9, ceacam1, *high-mobility group box 1* (HMGB1), y ligando de fosfatidilserina (PSL). En lugar de inhibir la progresión del ciclo celular como LAG-3, TIM3 regula la apoptosis después de la unión a su ligando; y 3) TIGIT, que contiene dos motivos inhibidores inmunorreceptores basados en tirosina en su dominio intracelular y amortigua la hiperactivación de las células T, se está investigando como un objetivo de punto de control.

2.2.4 Señalización por citoquinas

El entorno de citoquinas en el momento de la activación del TCR y de los co-receptores es crucial para determinar el destino y funcionalidad de esa célula T, tanto CD4 como CD8 (Curtsinger and Mescher, 2010). De forma global, la señalización a través de las diferentes citoquinas es fundamental para mantener la transcripción de numerosos genes necesarios para la supervivencia, diferenciación, mantenimiento y las funciones efectoras (**Figura 4**).

Supervivencia: En primer lugar, la activación de las células T naïve desencadena la producción de IL-2 y la expresión de la subunidad del receptor de alta afinidad IL-2 α (CD25), potenciando la señalización autocrina de la IL-2 y con ello su proliferación y supervivencia.

Diferenciación: Las citoquinas presentes en el medio donde se activan las células T CD4 determinan su diferenciación a Th1, Th2 o Th7 entre otros. En el caso de las células CD8, la señalización por citoquinas proinflamatorias como IL-12 e IFN de tipo I (IFN α/β) es crítica, indicando que el "peligro" está presente y por tanto, confirmando a la célula CD8 citotóxica que tiene que ejercer su papel (Curtsinger and Mescher, 2010).

Mantenimiento: La supervivencia de las células memoria no requiere de activación vía TCR pero sí depende de la señalización de citoquinas de mantenimiento como son IL-7 e IL-15, las cuales permiten la expresión de factores anti-apoptóticos, y una proliferación baja, de autorrenovación, y así una vida larga y persistente. En este proceso parece que otras citoquinas como IL-12 e IFN α/β están también involucradas (Curtsinger and Mescher, 2010).

2.2.5 Transducción de la señalización de las células T y sinapsis inmunológica

El TCR está formado por cadenas de glicoproteínas α y β únicas altamente polimórficas (una pequeña población de células T alberga cadenas γ y δ) que contienen regiones variables y constantes, similares a las inmunoglobulinas, con regiones intracelulares demasiadas cortas para transducir señales. Por ello, este complejo está asociado no covalentemente a un grupo de cadenas de señalización no polimórficas llamados CD3; γ , δ y ϵ , las cuales contienen un dominio ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) y cadenas CD3 ζ , que incluyen tres dominios ITAMs (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

Tras el contacto físico de la célula T con la APC, hay una movilización de proteínas asociadas al TCR en superficie y también proteínas intracelulares en una estructura llamada *ojo de buey*, sinapsis inmunológica o SMAC (*supramolecular activation cluster*). En el centro (c-SMAC), se agrupan el complejo TCR/CD3, correceptores CD4/CD8, CD28 y proteína quinasa C (PKC)- θ entre otras proteínas adaptadoras. En esta región, la distancia entre membranas de la célula T y la APC es de 15 nm. En la periferia, se pueden encontrar las diferentes integrinas necesarias (LF1-A) para estabilizar la sinapsis, con una distancia de 40nm. Esta distribución favorece la rapidez y mantenimiento de la señalización intracelular y también la liberación de perforina y granzima por parte de los linfocitos citotóxicos para las células diana (Fig 4).

Así, tras la activación vía TCR:MHC, se produce un cambio conformacional, generando la agrupación de moléculas CD3 (*clustering*). Además, junto al TCR podemos encontrar las moléculas co-receptoras CD4/CD8, las cuales llevan constitutivamente asociada la molécula Lck, una tirosina-quinasa de la familia de Src. La activación del TCR desencadena la fosforilación de tirosina de los motivos ITAM, presentes en el complejo TCR-CD3. Dichos ITAM funcionan orquestando la activación secuencial de las proteína-quinosas (PTK) relacionados con Src: Lck y Fyn, las cuales inician la señalización de TCR, seguidos por el de ZAP70, que amplifica aún más la respuesta. Lck se activa por la interacción de MHC con CD4 /CD8. Estas diversas PTK inducen la fosforilación de tirosina de varios polipéptidos, incluido el activador de enlace adaptador transmembrana para células T (LAT) que va a reclutar y fosforilar otras proteínas al signalosoma, amplificando así la señal (**Figura 5**) (Patarroyo S. and Vargas V, 2013).

Con todas estas posibilidades de interacciones, la activación vía TCR puede seguir tres rutas principales (Hwang *et al.*, 2020):

1. Activación de la ruta PI3K/Akt: finalmente se fosforilará Akt, la cual tiene la capacidad para fosforilar dianas necesarias para la supervivencia, inactivando factores pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2.
2. Ruta de la MAPK. A través de esta vía, se activará la señalización por ERK, JNK y p38. Cuando se activan ERK y JNK por las cascadas de fosforilación, acaban translocando a núcleo para activar a c-Fos y c-Jun, respectivamente, los cuales conforman el factor de transcripción proinflamatorio AP-1. La activación de las MAPKs provocará además un reordenamiento en el citoesqueleto para la formación de la sinapsis inmunológica.
3. Activación de la vía PKC y calcio. Tras la activación de PLC γ se libera inositol trifosfato (IP $_3$) que producirá un incremento de calcio citosólico, activando a calcineurina y favoreciendo la entrada del factor de transcripción NFAT al núcleo. El calcio citosólico junto al diacilglicerol (DAG) unido a la membrana van a activar a la PKC, la cual, después de muchos pasos intermedios, provocará la activación y translocación del factor de transcripción NF- κ B. Este DAG también colaborará en la activación de las rutas de Ras/ERK y MAPK.

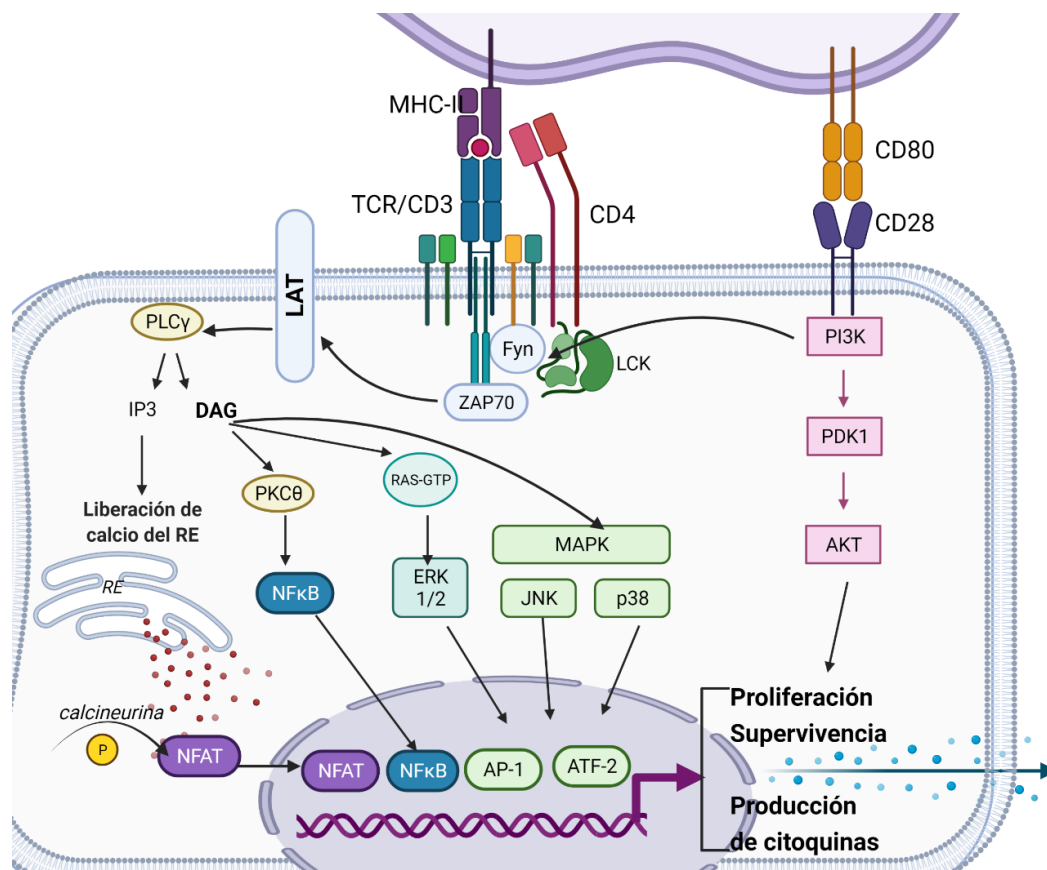


Figura 5. Representación esquemática de las principales moléculas que participan en la señalización del TCR en la célula T.

Todas estas rutas contribuyen en la expresión de genes necesarios para la supervivencia (incremento de los factores Bcl-2 y Bcl-X,) proliferación, (secreción de IL-2 y expresión de su

receptor), inflamación, diferenciación y función efectora de las células T, activando los factores de transcripción NFAT, AP-1, ATF-2 y NF- κ B (**Fig. 5**).

2.3 BALANCE ENTRE ACTIVACIÓN: SOBREATIVACIÓN Y AGOTAMIENTO.

Existe un delicado balance entre los diferentes mecanismos de la célula T y grados de activación. Si no hay activación suficiente, es decir, en ausencia de coestimulación, la célula T entra en anergia. Si, por el contrario, hay una fuerte activación, continuada y repetida, llevará a una sobreactivación, diferenciación a efectoras y a una muerte inducida por activación. Por ejemplo, en el caso de la inmuno-vigilancia tumoral, si la activación de las células T no consigue eliminar por completo al antígeno tumoral, se genera una respuesta sostenida ineficiente que lleva a las células T a un agotamiento crónico y a la muerte inducida por activación (AICD, del inglés *Activation Induced Cell Death*). El resultado final es la pérdida de función citotóxica global y progresión tumoral.

2.3.1 Muerte inducida por activación (AICD)

La AICD de las células T es un proceso necesario para regular el sistema inmunológico periférico y evitar el daño por células hiperreactivas o autorreactivas y mantener así la homeostasis. Durante la expansión temprana tras exposición antigénica, las células T son resistentes a la AICD y dejan de serlo en la fase de contracción. La AICD en las células T genera una apoptosis a través de la vía Fas/FasL principalmente, por lo que el control o distribución de la expresión de Fas y/o FasL afecta en los diferentes grados de AICD en las células T y se ve muy influenciada por la activación de la célula T tanto por TCR como por citoquinas como IFN- γ , IL-2 e IL-4 (Arakaki *et al.*, 2014a)

Se ha observado que una regulación deficiente o alterada de la AICD contribuye de manera clara a la severidad de varias enfermedades. Una falta de AICD eficiente está implicada en ciertas enfermedades autoinmunes mientras que por el contrario, una alta expresión de CD95 (Fas), y por tanto una mayor apoptosis dependiente de Fas tanto en CD4 como CD8, correlaciona con peor avance en los pacientes con SIDA (Mitra, 1996).

Todos los aspectos planteados en este apartado son fundamentales para la mejora de inmunoterapia con células T frente a los diferentes tipos de tumores refractarios.

3 INMUNOTERAPIA PARA EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

3.1 CONCEPTO DE INMUNOTERAPIA

El objetivo de la inmunoterapia consiste en potenciar, impulsar, aprovechar el poder intrínseco del sistema inmunológico del propio paciente para el tratamiento de diferentes enfermedades. Existe una amplia gama de estrategias que incluyen desde la administración de citoquinas, quimiocinas o anticuerpos monoclonales hasta la terapia celular adoptiva para estimular al sistema inmunitario para combatir el cáncer, o bien, desactivarlo para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o evitar el rechazo en trasplantes.

A pesar de que la inmunoterapia nos parece un concepto reciente, sus inicios se remontan al antiguo Egipto, de los que se conservan algunos informes que documentan la desaparición “espontánea” de ciertos tumores, a veces asociadas a infecciones que provocaban fiebre alta (Aranda *et al.*, 2019). Estas observaciones serían descritas de manera independiente en el siglo XIX por los médicos alemanes, Busch y Fehleisen, una regresión significativa de tumores en varios pacientes tras infección cutánea accidental con erisipela (causado por *Streptococcus pyogenes*, identificada posteriormente por Fehleisen). Busch y Fehleisen fueron los primeros en infectar a un paciente con cáncer con erisipela y con *Streptococcus pyogenes* aislada. Esto sirvió para establecer las bases de la inmunoterapia, la cual fue desarrollada por William Coley, un cirujano americano especializado en sarcoma óseo del Hospital Memorial de Nueva York considerado hoy como el “padre de la inmunoterapia” (Waldman, Fritz and Lenardo, 2020). Durante más de 43 años, trató a más de 1000 pacientes desahuciados con tumores inoperables, la gran mayoría sarcomas, mediante la inoculación de cócteles de bacterias inactivadas por calor (conocidas como las “Toxinas de Coley” entre las que se incluían *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*). A pesar del notable éxito y más de 70 años de uso, las Toxinas de Coley fueron muy criticadas y descategorizadas por la FDA a fármaco de uso investigacional al carecer de los controles adecuados y reproducibilidad. Finalmente, un ensayo clínico controlado en 2012 (Karbach *et al.*, 2012) demostró su papel antitumoral, dirigido por el Dr. Lloyd Old, considerado como el otro padre de la inmunoterapia moderna y con ello, la idea de Coley de estimular el sistema inmunológico podría ser efectivo en el tratamiento antitumoral. Esta idea constituye la base para un tratamiento hoy en día de primera línea del cáncer de vejiga superficial utilizando el bacilo de Calmette-Guérin (BCG, TICE®, TheraCys®, una cepa inactivada de *Mycobacterium bovis* que se inocular directamente en la vejiga) (Guallar-Garrido and Julián, 2020).

3.2 TIPOS DE INMUNOTERAPIA

Las inmunoterapias pueden ser clasificadas como pasivas o activas (Waldman, Fritz and Lenardo, 2020). En el primer caso, se pretende estimular la capacidad del sistema inmunológico para atacar a las células tumorales (inhibidores de punto de control, citoquinas) mientras que en la inmunoterapia activa se pretende dirigir específicamente la terapia antitumoral a través del sistema inmunitario (terapia celular adoptiva). Y pueden ser usadas tanto solas como combinadas con otros tratamientos antitumorales (Carlson *et al.*, 2020).

A continuación, se describen brevemente los tipos de inmunoterapias, fármacos aprobados y sus principales desventajas.

3.2.1 Terapia con anticuerpos monoclonales y puntos de control inmunológico

Los anticuerpos monoclonales (mAb) como herramienta inmunoterapéutica, están siendo utilizados no solo como tratamiento antitumoral, sino para modular la respuesta inmunológica en general. Hoy en día se le considera un componente principal de la terapia contra el cáncer, junto con la cirugía, la radiación y la quimioterapia. De hecho, más de 42 anticuerpos monoclonales antitumorales han sido aprobados por la FDA y EMA para su uso clínico desde 1997, empezando con la autorización de Rituximab, un mAb anti-CD20 para linfoma no-Hodgkin y leucemia linfocítica crónica (FDA, 2020).

Los mAb son una plataforma muy versátil que permite una alta especificidad y actualmente tenemos mAb frente a diversos antígenos de tumores hematológicos (como CD20, CD38, CCR4, CD22, CD30) y tumores sólidos (HER2, EGFR, VEGFR2, GD2, PDGFR, entre otros), así como mAbs dirigidos frente a inhibidores de punto de control inmunológico (PDL1, PD1) (revisados por (Zahavi and Weiner, 2020)). Los mAb pueden combinarse entre sí para generar los denominados *engagers* o adaptadores de células T bi-específicas (BiTE) que son anticuerpos bi-específicos frente a CD3 y frente a un antígeno de la superficie del tumor. Por ejemplo, blinatumomab aprobado en 2014 como inmunoterapia frente a LLA-B, tiene doble especificidad para CD3 y CD19. La doble especificidad de los BiTE puede acercar las células T a las células tumorales, mejorando así la formación de sinapsis inmunológica y la citotoxicidad antitumoral, aunque tienen una vida media extremadamente corta. Actualmente hay varios diseños de BiTEs para el MM y linfomas en fase I/II con resultados muy prometedores. De hecho, se espera su aprobación como medicamentos en los próximos años, ya que, se están observando respuestas parciales en pacientes poli-refractarios previamente tratados con células CAR-T o con otros tratamientos previos y con perfiles de seguridad muy aceptables (Einsele *et al.*, 2020).

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales frente a neoplasias hematológicas aprobados para clínica.

Diana	Nombre	Tratamiento	FDA*
Anti-CD20	Rituximab	B-LNH, LF, LCM, LCC	1997
	Ofatumumab	LLC	2009
	Obinutuzumab	LLC, LF	2013
Anti-CD52	Alemtuzumab	LLC, LC de células T	2007
Anti-CD38	Daratumumab	MM	2015
Anti-SLAMF7	Elotuzumab	MM	2015
Anti-CCR4	Mogamulizumab	LC de células T	2018
Anti-CD19, CD3	BiTE-blinatumomab	LLA	2014
Anti-CD30 conjugado	Brentuximab vedotin	LH	2017
Anti-CD22 conjugado	Inotuzumab ozogamicina	LLA	2017

* Año de aprobación como tratamiento para cualquiera de sus indicaciones, datos de la FDA.

LNH: Linfoma No-Hodgkin; LF: Linfoma folicular; LCM: Linfoma de células del Manto; LCC: linfoma linfocítico crónico; MM: Mieloma múltiple. LC: Linfoma crónico. LLA: leucemia linfoblástica aguda; LH: linfoma de Hodgkin.

Sin embargo, una de las principales limitaciones de las estrategias dirigidas a antígenos tumorales específicos es la relativa facilidad con que los tumores evolucionan perdiendo dichos antígenos. Por ello se viene investigando diferentes maneras de atacar directamente a los puntos de control inmunitario que los tumores desarrollan para bloquear su actividad. Estas estrategias están siendo realmente efectivas frente a diferentes tipos de tumores, tanto solas como en combinación con otras terapias.

Los inhibidores de los puntos de control inmunológico (ICIs, del inglés *Immune Checkpoint Inhibitors*) representan una revolución en la inmunoterapia contra el cáncer, formando actualmente parte de la primera línea de tratamiento en tumores avanzados y metastásicos (melanoma, carcinoma renal y carcinoma de pulmón de células no pequeñas) (Vaddepally *et al.*, 2020). Sharma y Allison (2015) destacaron la importancia de utilizar como diana los ICIs para incrementar la respuesta antitumoral en células tumorales (Sharma and Allison, 2015). Así, demostraron que CTLA-4, que desactiva la respuesta a las células T, podría ser una diana interesante para mejorar la destrucción de las células tumorales lo que sirvió como punto de partida para la identificación de otros puntos de control con potencial terapéutico.

La inmunoterapia clínica con anticuerpos monoclonales para bloquear los ejes CTLA-4 PD-1 o ligando de PD-1 (PD-L1) ha sido aprobada por la FDA como ICIs para el tratamiento de varias neoplasias como melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma renal, linfoma de Hodgkin, carcinoma de células de Merkel, cáncer de cabeza y cuello y carcinoma de vejiga, entre otras (Tabla 2, adaptada de Vaddepally *et al.*, 2020).

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales aprobados como ICICs para la terapia antitumoral.

Nombre comercial	Nombre	Diana	Año	Tratamiento
Yervoy	Ipilimumab	Anti-CTLA4	2011	Melanoma metastásico; Carcinoma de células renales; Cáncer colorrectal
Yervoy+ Opdivo	Nivolumab+ Ipilimumab	Anti-PDL1, CTLA-4	2015	Carcinoma renal avanzado Melanoma metastásico
Opdivo	Nivolumab	Anti-PD1	2014	Melanoma metastásico; Linfoma de Hodgkin; Mesotelioma pleural maligno Cáncer de pulmón, de cabeza y cuello y colorrectal Carcinoma de células renales, urotelial, hepatocelular y de esófago
Keytruda	Pembrolizumab	Anti-PD1	2014	Melanoma metastásico; Linfoma de Hodgkin Cáncer de pulmón, de cabeza y cuello, gástrico, de cuello uterino y endometrial Carcinoma urotelial, hepatocelular, de esófago y de células de Merkel, renales y escamosas
Libtayo	Cemiplimab	Anti-PD1	2018	Carcinoma de células escamosas y de células basales Cáncer de pulmón de células no pequeñas
Tecentriq	Atezolizumab	Anti-PDL1	2016	Cáncer de vejiga, de pulmón y de mama Carcinoma hepatocelular; Melanoma metastásico
Bavencio	Avelumab	Anti-PDL1	2017	Carcinoma de células de Merkel, urotelial y de células renales
Imfinzi	Durvalumab	Anti-PDL1	2017	Cáncer de pulmón

Aunque estas terapias con ICIs, conducen a menudo a una respuesta más duradera que la quimioterapia o las terapias dirigidas, la evidencia clínica acumulativa indica tasas de respuesta insatisfactorias, con una baja respuesta en la gran mayoría de los tumores y con efectos secundarios de carácter autoinmune (Choi and Lee, 2020) que si bien, la mayoría son reversibles como los de origen dermatológicos o gastrointestinales, aquellos que afectan al sistema endocrino pueden ser permanentes. Aunque infrecuentes, también se han reportado muertes asociadas a miocarditis, pneumonitis, colitis y eventos neurológicos entre otros (Wang *et al.*, 2018).

Si bien en el caso del linfoma de Hodgkin, la terapia anti-PD1 es un éxito debido en parte a la alta expresión de PD-L1 en las células tumorales, en otras neoplasias como MM o LLC (también con una alta expresión de PD-L1), no han manifestado los mismos efectos (Dong and Ghobrial, 2019a). Igualmente, la terapia anti-PD-1/PD-L1 es prácticamente ineficaz en muchos tipos de cáncer, como el cáncer colorrectal con estabilidad de microsatélites (He and Xu, 2020).

En general, los tumores que responden a ICI tienen mayores niveles de infiltrados inmunitarios (tumores calientes), mientras que los no respondedores suelen tener poca infiltración

(tumores fríos) (Umansky *et al.*, 2019). Sin embargo, este modelo por sí solo no puede explicar completamente la falta de respuesta de muchos pacientes tratados con ICIs. La clasificación de los tumores en aquellos que tienen una intensidad de mutación tumoral (TMB, del inglés *Tumor Mutation Burden*) alta o baja ayuda a explicar la respuesta clínica a los ICIs de muchos tumores.

Así, los tumores de TMB alta tienen niveles más altos de neoantígenos frente a los que puede responder el sistema inmunitario, al contrario que los que tienen una TMB baja. De este modo, tumores calientes con una TMB alta serán, en principio los más respondedores, mientras aquellos tumores fríos con TMB baja tendrán menor posibilidad de respuesta a ICI (Bai *et al.*, 2020a).

Es por ello que se ha aprobado por la FDA la combinación sinérgica de anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y anti-PD-1 para el tratamiento del melanoma avanzado, para cáncer colorrectal metastásico con alta TMB y para el carcinoma renal avanzado. Estos medicamentos han mejorado la tasa de respuesta general de los pacientes (Bai *et al.*, 2020a), aunque también se han visto incrementados los efectos adversos asociados. En este contexto, las citocinas se están incorporando también en ensayos clínicos combinados, principalmente junto con anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y anti-PD-L1 (Berraondo *et al.*, 2019). Aun así, otros marcadores de agotamiento adicionales como TIM3, LAG-3, TIGIT que a menudo se encuentran co-expresados con PD-1 en las células T agotadas (Anagnostou and Ansell, 2020), podrían ser una diana potencial para las terapias de combinación y es por ello que se están desarrollando nuevos anticuerpos.

Es por tanto evidente que, a pesar del inmenso potencial de los ICIs, existe la urgente necesidad de comprender completamente la biología básica de los puntos de control inmunológico y desarrollar nuevas estrategias antitumorales (He and Xu, 2020).

3.2.2 Virus oncolíticos en inmunoterapia antitumoral

Los virus oncolíticos son una clase de agentes terapéuticos que infectan y se replican preferencialmente en las células tumorales, induciendo la muerte directa de las células infectadas e iniciando además respuestas inmunitarias sistémicas a través de DAMPs (del inglés *Damage associated molecular pattern*) y PAMPs (del inglés *Pathogen associated molecular pattern*), que pueden incluso convertir un “tumor frío”, sin células del sistema inmunitario infiltradas, en un “tumor caliente”, como se ha demostrado en un ensayo clínico de fase I en combinación con anti-PD1, promoviendo la expresión de PD-L1 y mejorando la respuesta a la inmunoterapia combinada (Ribas *et al.*, 2017).

La gran mayoría de los virus oncolíticos en terapia antitumoral son cepas atenuadas o con bajo peligro de causar una enfermedad grave en los humanos. A pesar de su alto potencial, un

solo tipo de agente viroterápico puede no ser efectivo por lo que constituye un verdadero reto identificar el virus que mejor actuará sobre el tipo de cáncer del paciente, con su heterogeneidad, cómo administrarlo (es común presentar una inmunidad preexistente a estos tipos de virus) y que sea capaz de activar a su sistema inmunitario. Actualmente podemos encontrar estrategias basadas en virus *vaccinia*, *coxsackie*, adenovirus (constituyendo el tipo principal), reovirus, herpes-simplex, picornavirus, entre otros, tanto a nivel investigacional como ensayos clínicos frente a diferentes tipos de tumores, administrados en la gran mayoría de los casos, de manera intratumoral tanto solos o combinados con quimioterapia o inmunoterapia (revisados en (Umansky *et al.*, 2019).

El primer virus oncolítico aprobado por una entidad sanitaria fue un adenovirus recombinante denominado Oncorine o H101, como terapia combinada con quimioterapia para el carcinoma nasofaríngeo en 2005 por la *China Food and Drug Administration Department* (CFDA). Se trata de adenovirus atenuado, muy similar a su precursor Onyx-15 (Gendicine), los cuales han sido diseñados para eliminar un mecanismo de defensa viral que interactúa con un gen humano normal p53, que con mucha frecuencia está desregulado en las células cancerosas, por lo que sólo células p53 mutadas, habrá replicación viral. Ambos vectores han demostrado un efecto antitumoral sinérgico cuando fueron combinados con radio o quimioterapia, cirugía y/o hipertermia (Mondal *et al.*, 2020).

Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados con Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlyic), aprobado por la FDA y por la EMA en 2015. T-VEC es un virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) oncolítico administrado intratumoralmente que está atenuado para la replicación selectiva de células cancerosas y codifica GM-CSF para promover la acumulación local de células dendríticas y facilitar las respuestas inmunitarias antitumorales (Mondal *et al.*, 2020).

Otros virus oncolíticos que muestran resultados prometedores en los ensayos clínicos son Pexa-Vec (derivado del virus *vaccinia* que expresa GM-CSF contra el carcinoma hepatocelular, actualmente en fase I/II, NCT03206073) y CG0070 (adenovirus modificado que expresa GM-CSF contra el cáncer de vejiga en combinación con Pembrolizumab, Keytruda, (NCT04387461, fase II, para pacientes refractarios al tratamiento con el bacilo de Calmette-Guérin), entre otros (Mondal *et al.*, 2020).

3.2.3 Terapia antitumoral con citoquinas

Las citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular (generalmente menor de 30 KDa) y vida media limitada que intervienen en la comunicación de las células de manera auto- o paracrina, participando en el crecimiento, diferenciación, inflamación y supervivencia. Las citoquinas actúan uniéndose a sus receptores (con baja, media o alta afinidad) en la superficie de

la célula diana, pudiendo actuar en sinergia o antagonismo con otras citoquinas, generando una respuesta con varios grados de complejidad (Berraondo *et al.*, 2019).

Entre 1980 y 1990 se estudió exhaustivamente el potencial antitumoral de varias citoquinas recombinantes, sin embargo, la corta vida media de la gran mayoría de las citoquinas y los altos grados de toxicidad cuando se administraban de forma sistémica, aportaba una ventana terapéutica muy estrecha y por tanto, sólo IFN- α e IL-2 fueron aprobadas por la FDA para el tratamiento de leucemia de células pilosas, melanoma maligno, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, linfoma folicular no Hodgkin y para el tratamiento de carcinoma renal avanzado y melanoma metastático, respectivamente (Berraondo *et al.*, 2019).

Aunque depende de la tolerabilidad del paciente, la administración es normalmente intravenosa cada 8h. El uso clínico de estas citoquinas como medicamentos supuso la primera demostración de un efecto beneficioso de la inmunoterapia, aunque con bajas tasas de respuesta y alta toxicidad, ha quedado relegada al uso de inhibidores de punto de control inmunológicos o terapia celular adoptiva.

Para incrementar la vida media y especificidad se han diseñado y combinado diferentes estrategias. Una de ellas es la generación de inmuno-citoquinas, proteínas quiméricas compuestas de dos dominios: un dominio con capacidad de unión a un antígeno tumoral y otro que es una citoquina. Por ejemplo, cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), es una inmuno-citoquina monomérica dirigida al antígeno tumoral CEA que contiene dos dominios, por un lado, la variante de IL-2 (IL2v) fusionada a un anticuerpo (sin Fc) de alta afinidad por el antígeno específico del antígeno (CEA). De esta manera se localiza y dirige IL-2 en el entorno tumoral, resultando en una potente eficacia preclínica frente a tumores sólidos CEA+ en combinación con anti-PD-L1 (Klein *et al.*, 2017). Actualmente se encuentra en fase I para tumores metastásicos (NCT02350673).

3.2.4 Inmunomoduladores frente al cáncer

El panorama farmacológico frente al tratamiento de linfomas incluye pequeñas moléculas con potencial inmunomodulador que han resultado bastante exitosas y presentan una serie de ventajas sobre el resto de inmunoterapias (anticuerpos y terapia celular) como es el bajo coste de producción, fácil administración y control y que pueden afectar a varias vías de señalización. Por ejemplo, existen pequeñas moléculas que actúan sobre la ruta PI3K/Akt/mTOR (alterada las células B tumorales), sobre la señalización del BCR (sobreactivada en algunos tumores del linaje B) o favoreciendo la apoptosis (reducida en la mayoría de los tumores) (Anagnostou and Ansell, 2020).

A continuación, se describen brevemente las moléculas más relevantes y efectivas frente al tratamiento de estas neoplasias hematológicas que han sido aprobadas por la FDA/EMA (Tabla

3). Estos inhibidores afectan principalmente a la recepción y transducción de la señal en la célula B a diferentes niveles.

Tabla 3. Inhibidores utilizados en clínica para el tratamiento de neoplasias hematológicas tanto en monoterapia como con anticuerpos monoclonales.

Ruta de señalización	Diana	Fármaco	Tratamiento
Receptor de la célula B	BTK	Ibrutinib	LLC, LCM, LLP
	BTK	Acalabrutinib	LLC, LLP
PI3K/Akt/mTOR	FKBP-12/mTOR	Temsirolimus	LCM R/R
	PI3K γ	Idelalisib	LLC
	PI3K δ y PI3K γ	Duvelisib	LLC, LLP, LF
	PI3K- α y PI3K- δ	Copanlisib	LF
Apoptosis	BCL-2	Venetoclax	LLC, LLP, LF
Factores de transcripción	Cereblon/Ubiquitina ligasa E3	Lenalidomida y derivados	LCM R/R, LF/MM
BCR-ABL	ITK	Imanitib	LLA con Ph+
	ITK	Dasatinib	LLA con Ph+

LLC: Leucemia linfocítica crónica, LLC: Linfoma de células del manto, LLP: Linfoma linfocítico pequeño. R/R: refractario/recidivante. LF: Linfoma folicular. MM: mieloma múltiple. LLA: leucemia linfoblástica aguda. ITK: citPh+: cromosoma Philadelphia positivo.

El inhibidor de la tirosina kinasa de Bruton (BTK), Ibrutinib o el inhibidor de PI3K δ , Idelalisib, se desarrollaron originalmente para las neoplasias malignas de células B que dependen de su actividad para la supervivencia del tumor, como la LLC o el linfoma de células del manto (Dong and Ghobrial, 2019b).

Los inhibidores de BTK como Ibrutinib o Acalabrutinib se han aprobado junto con anticuerpos monoclonales y se están estudiando en combinación con inhibidores de puntos de control en ensayos clínicos (Dong and Ghobrial, 2019b).

Otros compuestos como Imanitib o Dasatinib inhiben otras tirosinas quinasas inducibles (ITK) se usan en las LLA con la translocación cromosómica BCR-ABL (cromosoma Philadelphia).

Algunos medicamentos como Venetoclax son activadores de la apoptosis e inhiben BCL-2, restaurando así la apoptosis del linfocito B tumoral. Venetoclax se administra como monoterapia o en terapia combinada con anticuerpos monoclonales anti-CD20.

La lenalidomida y derivados, procedentes de la talidomida, son considerados como fármacos inmunomoduladores, aunque también poseen propiedades anti-angiogénicas y anti-proliferativas, lo que genera una triple respuesta antitumoral. Su mecanismo de acción es complejo, pero parece estar relacionado con el incremento de la degradación de determinadas proteínas vía proteasoma (D'Souza, Prince and Neeson, 2021).

3.2.5 Terapia celular adoptiva

La terapia celular adoptiva (ACT) consiste en la utilización de células del propio paciente o de un individuo sano con fines terapéuticos. Tradicionalmente, esta estrategia se ha utilizado tanto para incrementar la respuesta inmune frente a tumores o agentes infecciosos (Gattinoni *et al.*, 2006), como para promover tolerancia en situaciones de enfermedades inmunes o rechazo (Riley, June and Blazar, 2009). Entre las que más éxitos han cosechado en la lucha contra los tumores destacan los tratamientos con progenitores hematopoyéticos (HSCs). Sin embargo, los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) y las células dendríticas también han cosechado algunos logros destacables.

Con la finalidad de centrar la introducción en aquellas estrategias más cercanas a lo que se aborda en esta Tesis, a continuación, describiremos brevemente la ACT basada en TILs para posteriormente definir en el siguiente apartado un nuevo tipo de ACT, las células CAR-T, que se está abriendo camino gracias a la combinación de las técnicas de terapia celular y la terapia génica, y que será el objeto de trabajo de esta Tesis.

3.2.5.1 Linfocitos infiltrantes de tumores (TILs)

En 1986, Rosenberg y colaboradores del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) publicaron una estrategia de ACT que incluía el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs, del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) de sujetos con melanoma, su expansión *in vitro* con IL-2 y su posterior re-infusión al paciente (Rosenberg, Spiess and Lafreniere, 1986). Esta estrategia terapéutica resultó en la regresión del melanoma metastásico en la mitad de los pacientes tratados, con respuestas completas del 10-20% y una duración de tres a cinco años (Rosenberg *et al.*, 1988).

Los TILs son linfocitos que de manera natural se encuentran dentro de ciertos tumores, tras haber penetrado el TME y que son capaces de reconocer neoantígenos y antígenos asociados a tumores. Estos TILs pueden ser aislados, expandidos *ex vivo* y re-infundidos en los mismos pacientes, generando una respuesta antitumoral capaz de provocar una regresión. Recientemente, el grupo del Dr. Rosenberg describió que existen diferentes subpoblaciones de TILs en el entorno tumoral y que el tipo de TILs que media la respuesta antitumoral (progenitores memoria CD8+CD39-) es diferente de la subpoblación de TILs enriquecida en reactividad antitumoral (CD39+) (Krishna *et al.*, 2020).

La terapia TIL no se ha adoptado generalmente como una terapia contra el cáncer a pesar de su éxito frente a melanoma (Hudeček *et al.*, 2020), ya que la frecuencia es extremadamente baja en el tumor, por lo que requiere una mayor expansión *ex vivo*. Es una terapia personalizada para cada paciente, y obtener números suficientes de TIL es un desafío (se requieren 30 a 50 mil millones de TIL), requiriendo además mucho tiempo (generalmente de 5 a 6 semanas, aunque se

ha conseguido reducirlo a 22 días). Además, la terapia con TIL en otros tipos de cáncer, como el de mama, colon, ovario, próstata y páncreas, no mostró la misma actividad que en el melanoma, por lo que parece probable que sólo una fracción de los TIL extraídos de estos tipos de cáncer es reactiva al tumor (Paijens *et al.*, 2021).

Por otro lado, los TILs constituyen un material muy interesante desde un punto de vista más básico, como es la identificación de esos neoantígenos e investigar los mecanismos asociados por los cuales han sobrevivido a la fuerte inhibición del tumor, y también desde el punto de vista de la ingeniería de linfocitos (ver más adelante), ya que estos TILs son potenciales candidatos de este tipo de modificaciones para incrementar su potencial citotóxico (Rosenberg *et al.*, 1990). De hecho, los TILs fueron las primeras células T en ser modificadas mediante un vector gamma retroviral por el equipo de Rosenberg en 1990, consiguiendo introducir eficazmente un gen de resistencia a neomicina en los TILs previa a la infusión en los pacientes (Rosenberg *et al.*, 1990).

3.3 MEDICAMENTOS DE INMUNOTERAPIA FRENTE A TUMORES HEMATOLÓGICOS: NECESIDAD CLÍNICA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

Como hemos ido viendo a lo largo de la introducción, el panorama farmacológico frente al tratamiento de neoplasias de linaje B es bastante amplio y en los últimos años se han aprobado diversas estrategias de inmunoterapia para su aplicación en el tratamiento de diferentes tipos de tumores, tanto en primera línea como tras recaídas. Dado el foco de la presente Tesis, se indican a continuación, los medicamentos aprobados para el tratamiento de tumores hematológicos de tipo B más relevantes (sin incluir MM ni terapia con células CAR-T) en la Tabla 4.

Aunque varias inmunoterapias también han demostrado eficacia en pacientes con linfoma y LLA (como anticuerpos monoespecíficos, inhibidores de puntos de control inmunológico (anti-PD1) y otras moléculas inhibidoras), los ratios de remisión completa a largo plazo siguen siendo bajos.

En general, se manifiesta una necesidad clínica no cubierta de respuestas sostenidas duraderas, y una amplia gama funcional de estrategias para aplicar en caso de refractariedad y recidivas, que superen cada posible mecanismo de resistencia, no sólo para el tratamiento de neoplasias hematológicas sino para tumores sólidos.

Tabla 4. Resumen de los medicamentos para el tratamiento oncológico de los tumores de linaje de células B utilizados en España según la AEMPs.

	Tipo de tratamiento	Tratamientos	
LLA	Fase de Inducción	Corticosteroides, vincristina y antraciclinas, asparraginasas e inhibidores de la tirosina cinasa (ITK) en los casos cromosoma Philadelphia positivo	
	Fase de Consolidación	Citarabina, metotrexato, antraciclinas y agentes alquilantes	
	Fase de mantenimiento	6-mercaptopurina, metotrexato, vincristina y corticosteroides, entre otros	
	Pacientes de alto riesgo	Alo-THP	
	R/R		Quimioterapia de rescate, seguida de aloTPH
			Inotuzumab ozogamicina, (anticuerpo anti-CD22 conjugado)
		Blinatumomab (anticuerpo biespecífico anti-CD19)	
LDCBG	Estándar	Rituximab, ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona (R-CHOP)	
	R/R	Quimioterapia de rescate basada en platino (DHAP, GDP, ICE, IVE) +autoTPH	
LCM	Estándar	Ibrutinib	
	Estándar	Idelalisib	
LLC	IGVH mutado <65 años	Fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR)	
	IGVH mutado >65 años	Ibrutinib	
	IGVH mutado 65-70 años	Bendamustina más Rituximab (BR)	
	IGVH mutado >70 años	Clorambucilo más Obinutuzumab (ChI-O)	
	TP53 no mutado	Fludarabina, ciclofosfamida y Rituximab (FCR)	
	TP53 mutado	Ibrutinib	
	TP53 mutado /17p	Venetoclax	
	TP53 mutado	Idelalisib más Rituximab	
LH	Estándar	Quimioterapia con ABVD y el BEACOPP	
		Radioterapia	
	R/R	DHAP (dexametasona, altas dosis de citarabina y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, altas dosis citarabina y cisplatino), IGEV (ifosfamida, gemcitabina y vinorelbina) e ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido)	
		THP	
		LH R/R CD30+	Brentuximab vedotina (BV)
	LH R/R tras Auto-THP	Anti-PD1	
	Baja carga tumoral sintomáticos	Rituximab	
	Alta carga tumoral	Rituximab + agentes alquilantes	
	R/R	Trasplante, Bendamustina, Idelalisib	
	Refractario a Rituximab	Obinutuzumab+Bendamustina	

Elaborada con los informes de posicionamiento terapéutico de cada medicamento de inmunoterapia o inmunomodulador.

Considerando todo el conjunto, la inmunoterapia ha revolucionado el panorama antitumoral, hasta hace unos años meramente farmacológico, sumado a las pautas de cirugía y radioterapia. Sin embargo, la inmunoterapia presenta aún muchas limitaciones y desafíos. Hay pacientes no respondedores (tumores fríos y/o con baja carga mutacional), ciertas toxicidades potenciales asociadas a la terapia (siendo fatales en un 0.3% de los pacientes), una heterogeneidad tumoral que depende del tipo de tumor, del paciente e incluso de su microbiota, y unos mecanismos de resistencia que provocan un fallo en más de un cuarto de los pacientes tratados, manifestándose con resistencia primaria o resistencia adquirida en aquello que inicialmente responden al tratamiento (Bai *et al.*, 2020b).

Dentro de estas resistencias, se ha observado una pérdida de la diana tras el uso de anticuerpos monoclonales (como el Rituximab), fallos en la presentación antigénica (mutaciones que afectan degradación por proteasoma, transporte, pérdida de expresión de HLA o β 2-M), sobreexpresión de moléculas MHC-I no clásicas (como HLA-G) para escapar del mecanismo de acción antitumoral de las células NKs, entre muchas otras (Bai *et al.*, 2020b).

Respecto a los inhibidores de punto de control, se encuentra también la pérdida de la expresión de genes implicados en la señalización del Interferón como ha ocurrido en pacientes de melanoma tratados con anti-PD1 (Zaretsky *et al.*, 2016) y también en pacientes tratados con anti-CTLA-4 (Gao *et al.*, 2016), llevando a un fenómeno de *hiperprogresión tumoral*.

Así, queda patente la necesidad clínica de nuevas estrategias con una mayor potencia, con respuestas mantenidas a lo largo del tiempo que superen estas barreras.

4 TERAPIA CELULAR-GÉNICA: INGENIERÍA DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO

La forma más reciente de inmunoterapia entra dentro del campo de la terapia celular y genética y que se puede definir como inmunoterapia-génica (Restifo *et al.*, 1993). En esta estrategia, diversas células del sistema inmunitario se modifican genéticamente para expresar diferentes moléculas con la finalidad de incrementar sus funciones o de aportarles funciones nuevas.

Una de las estrategias de inmunoterapia génica más prometedoras es la ingeniería de linfocitos T con la finalidad de dirigir específicamente a las células citotóxicas hacia el tumor y de incrementar su potencia y supervivencia (células CAR-T, ver más adelante Ellis, Sheppard and Riley, 2021).

4.1 INGENIERÍA DE LINFOCITOS T

A pesar de que existen varias células hematopoyéticas muy atractivas para la inmunoterapia como son las células B y los macrófagos, las células T son el tipo más estudiado y constituyen actualmente un nuevo pilar de medicina. Esto es debido a una combinación de factores que van desde su fácil aislamiento y manipulación, junto a unas propiedades funcionales y de migración que los hacen excelentes candidatos para la inmunoterapia.

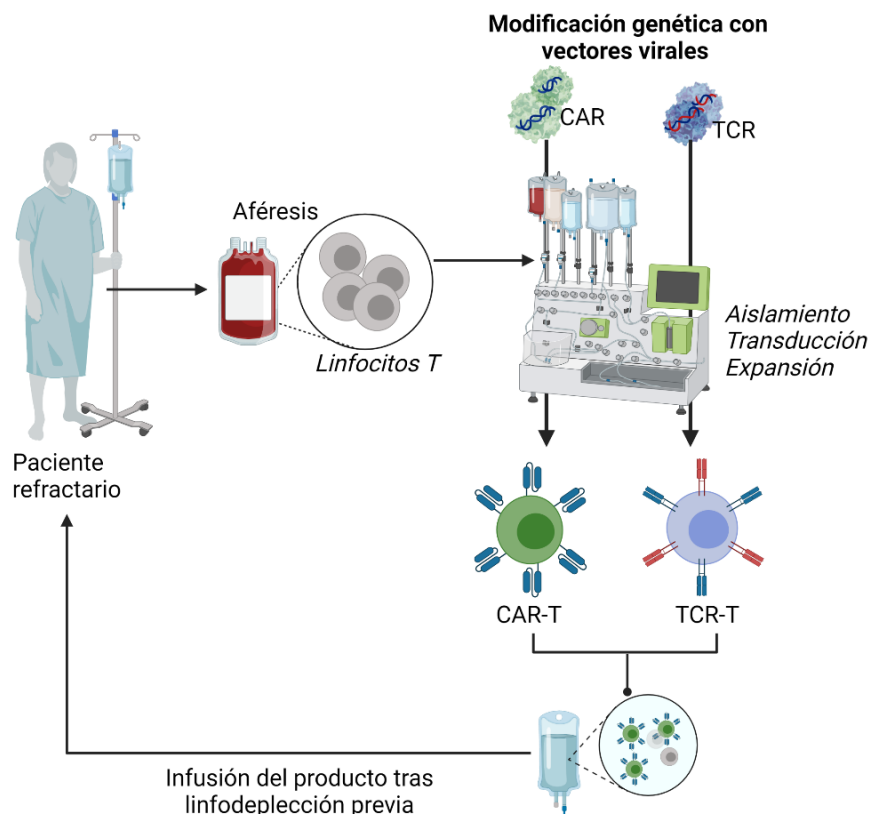


Figura 6. Proceso de modificación genética y manufactura en la terapia con ingeniería de linfocitos.

En general, las células T son aisladas de sangre periférica del paciente para ser genéticamente modificadas *ex vivo* con vectores virales (transducción) para expresar receptores sintéticos (CAR, TCR) que reconozcan específicamente ciertos antígenos presentados en moléculas MHC o de superficie. Tras su expansión y controles de calidad, las células T modificadas están listas para ser re-infundidas en el paciente previamente linfo-depleccionado.

Efectivamente, las células T son fácilmente obtenidas de sangre periférica, expandidas y modificadas *ex vivo* con métodos compatibles con buenas prácticas de manufactura (GMP) y para ser posteriormente re-infundidas en los pacientes (**Figura 6**). Además, los vectores de terapia génica desarrollados en las últimas décadas (ver más adelante) permiten realizar una modificación genética estable y segura de estas células, sin que se vea afectado durante este proceso las funciones y características de las células T.

4.1.1 Terapia con TCR transgénicos

Las células TCR-T se diseñan predominantemente para expresar una cadena TCR α y una cadena TCR β transgénicas para que reconozcan antígenos tumorales presentados en moléculas MHC utilizando generalmente un vector viral (γ -retroviral o lentiviral). El concepto surgió de la clonación de TCRs con especificidad tumoral presentes en los TILs (Zhao and Cao, 2019). Esta terapia celular adoptiva permite la redirección genética de la especificidad de los linfocitos T frente a antígenos presentes en las células tumorales como carcinoma de células escamosas de esófago de Nueva York (NY-ESO-1), antígeno asociado a melanoma MAGE-A3/A10 y Antígeno 1 del tumor de Wilms (WT1), con resultados muy interesantes en melanoma, mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda, entre otros. En la actualidad, existen más de 140 ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov, Global-T-Cell-Therapy-Market, 2021) con TCRs frente a diferentes neoplasias, especialmente tumores sólidos (melanoma y otros), quizá debido al tremendo éxito que han tenido las células CAR-T frente a los tumores hematológicos, pero con bajo éxito frente a tumores sólidos (Zhang and Wang, 2019). Así, podemos encontrar varias grandes farmacéuticas (Medigene, Bellicum Pharmaceuticals, Kite Pharma, Immatics y Adaptimmune Therapeutics, TScan, entre otras) implicadas en el desarrollo de productos frente a diferentes antígenos tumorales utilizando esta estrategia de TCR sintéticos, actualmente en fases I/II (Global-T-Cell-Therapy-Market, 2021).

La principal ventaja de esta estrategia reside que puede reconocer antígenos intracelulares presentados en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de tipo I (HLA-A, B, C) de todas las células nucleadas. El TCR transgénico que reconozca un péptido terapéuticamente relevante, por ejemplo, el antígeno altamente inmunogénico NY-ESO-1, es presentado por un tipo específico de HLA-A (Raza *et al.*, 2020) y activará señalización del TCR sintético,

provocando la expansión de esas células T. Esto supone una ventaja frente a las células CAR-T, que, en principio, sólo pueden reconocer antígenos de membrana.

Esta terapia consigue ratios de proliferación *ex vivo* mayores que los TILs, con un fenotipo menos agotado al no haber estado continuamente enfrentándose al tumor, pero no siendo eficaces en aquellos tumores donde hay una regulación a la baja de los antígenos tumorales o de las moléculas MHC clase I. Existe además una cierta dificultad de aislar esos TCR-específicos frente a antígenos tumorales sin que se produzca una reacción cruzada con tejidos sanos. Por otro lado, la purificación y expansión de grado GMP de las células TCR-específicas supone un desafío (Zhao *et al.*, 2021).

Dado que los tumores sólidos presentan una alta heterogeneidad antigénica. Existen grupos que buscan la identificación de todos los TCR de neoantígenos de un determinado tumor (Li and Ding, 2020) y la generación de poblaciones T-TCR específicas para todos ellos (Sim *et al.*, 2020). Sin embargo, estas aproximaciones aún requieren de tecnologías con un alto coste y que son difíciles de implementar en clínica.

Por otro lado, la presencia del TCR endógeno puede limitar la eficacia de las células T-TCR principalmente de dos maneras: mediante la competencia por el complejo CD3, reduciendo la expresión de TCR transgénico en la superficie y mediante el apareamiento incorrecto entre las cadenas TCR endógenas y transgénicas pudiendo generar nuevos TCR con autorreactividad y alorreactividad, comprometiendo así la terapia (Zhao and Cao, 2019).

4.1.2 Terapia con Receptores antigénicos quiméricos (CARs)

Dado que esta terapia es el objeto de mejora de esta Tesis, tanto la biología como los éxitos, efectos secundarios y alternativas de las células CAR-T serán desarrolladas en los próximos apartados. Aquí se presenta una visión global de dicha terapia.

La modificación de las células del sistema inmunitario con receptores quimérico antigénico (del inglés *Chimeric Antigen Receptor*, CAR) ha revolucionado completamente el campo de la terapia celular desde 1992. Prueba de ello es que, a día de hoy, cinco productos CAR-T frente a neoplasias hematológicas han sido aprobados desde 2017 como medicamentos de terapias avanzadas tanto por la FDA como por la EMA, con más de 900 y 300 ensayos clínicos para diferentes tipos de cáncer hematológico y tumores sólidos, respectivamente.

En principio, gracias a la versatilidad de las terapias CAR-T, se podría aplicar frente a cualquier antígeno extracelular, incluso en combinación con otras modalidades de inmunoterapia. Existen CAR-T frente a más de 100 dianas diferentes, tanto hematológicas (CD19 siendo el mayoritario, CD20, CD22, BCMA, CD38, CD4, CD7, CD30, CD33, CD123 entre otros) como

para tumores sólidos (Mesotelina, EGFR, GPC3, MUC1, GD2, CEA, EpCAM, IL13R α 2, PSMA, CAIX...entre otros) (Zhao and Cao, 2019).

La terapia con células CAR-T suponen hoy en día una nueva esperanza en pacientes con leucemias y linfomas refractarios tras varias líneas de tratamiento, y podría llegar en el futuro, no solo a establecerse como alternativa terapéutica para aquellos tumores donde otras estrategias no han tenido éxito, sino como primera línea de actuación, sobre todo en tumores altamente agresivos. En la actualidad, las terapias con CAR-T en tumores hematológicos se centran en aquellos pacientes refractarios a las diversas líneas de tratamiento aprobadas, incluyendo varias líneas de inmunoterapia como los inhibidores puntos de control inmunitario (ICIs) y/o los anticuerpos monoclonales frente a CD20, CD22 o CD19.

Como se explicó anteriormente, a pesar de su alto impacto en el tratamiento de diferentes tipos de tumores, la eficacia de los ICIs es muy a menudo incompleta o inexistente en pacientes con baja TMB y con mejores respuestas en tumores con alto TMB, siendo por tanto este último tipo de tumores la diana principal de los ICIs (**Figura 7**, señalados en gris). Por otro lado, los pacientes con tumores con baja TMB, como LLA, responden muy bien a inmunoterapia con anticuerpos dirigidos frente a CD22 y CD19. Esto sugiere que los tumores con baja TMB (**Figura 7**, señalados en rojo) pueden ser una buena diana para las terapias CAR-T (Sadelain, Rivière and Riddell, 2017).

Sin embargo, una respuesta altamente eficaz frente a los cánceres sólidos aún sigue siendo un reto, debido a factores como la alta heterogeneidad, localización/encapsulamiento del tumor y un TME altamente inmunosupresor. Además, la gran mayoría de los antígenos diana de la terapia con células CAR-T para tumores sólidos se expresan en tejidos sanos vitales para el individuo. Esto no aplica de igual manera a los tumores hematológicos, donde la heterogeneidad es mucho menor, son más accesibles y en el caso de los tumores tipo B, el tipo celular que expresa el antígeno diana (células B) no compromete fatalmente la vida del paciente.

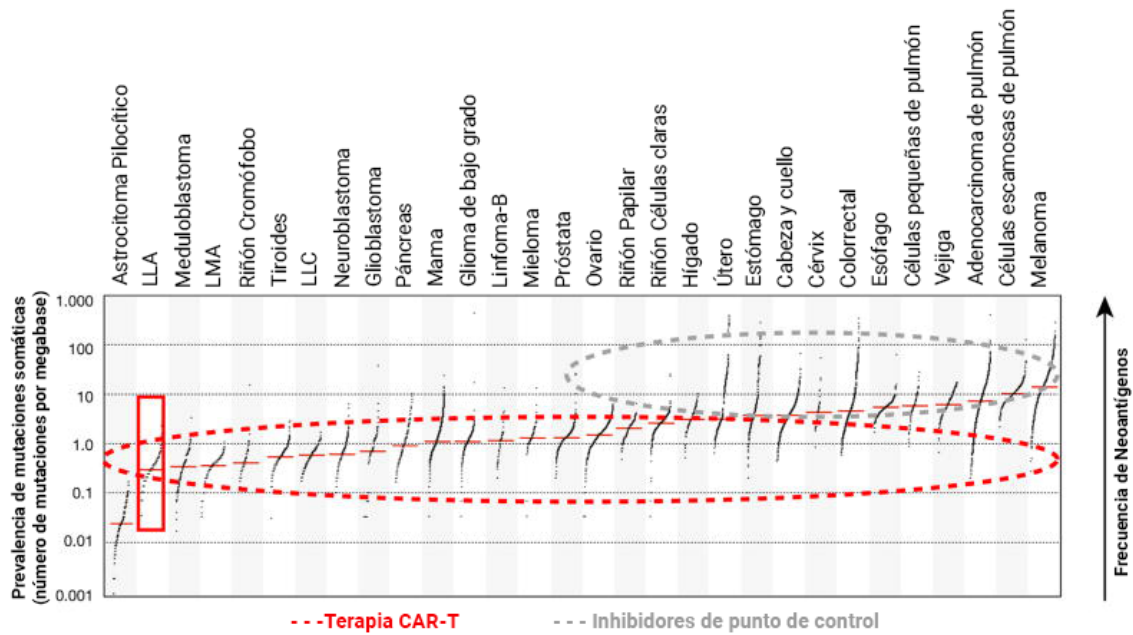


Figura 7. Relación de carga mutacional tumoral (TMB), frecuencia de neoantígenos y predicción del éxito de aplicación de terapia con células CAR-T en tumores con bajo TMB (en rojo) y tumores con alto TMB (ICIs, inhibidores de punto de control inmunológico). Adaptada de Sadelain, Rivière and Riddell, 2017.

4.2 INGENIERÍA DE OTRAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO

4.2.1 Células NK-CAR

Las células NKs suponen una población heterogénea y citotóxica, cuya activación no depende tampoco de HLA, como en las células CAR-T. Las células NK no requieren el reconocimiento del antígeno tumoral o la expansión clonal antes de destruir las células cancerosas. Las señales inhibitoras más importantes para las células NK están mediadas a través de sus receptores de tipo inmunoglobulina (KIR) asesinos, que reconocen el complejo principal de histocompatibilidad /antígenos HLA de clase I en células autólogas. Los receptores activadores se unen a ligandos expresados en las células tumorales e inducen la activación de las células NK (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

Una alternativa interesante es el uso de células NKs alogénicas procedentes de cordón umbilical o sangre periférica principalmente para mejorar la respuesta antitumoral, ya que las células de los pacientes suelen estar agotadas y las células NK tienen una capacidad intrínseca de reconocer y eliminar células tumorales que han perdido HLA- clase I, uno de los mecanismos típicos de escape antitumoral (Xie *et al.*, 2020). Liu y colaboradores (2020) consiguieron que el 73% de los pacientes tratados con células NK de sangre de cordón umbilical y modificadas para expresar el CAR frente a CD19 y la citoquina IL-15 respondieran duraderamente sin observar los efectos secundarios más típicos de la terapia con células CAR-T, como el CRS o neurotoxicidad

(NCT03056339) (Liu *et al.*, 2020). Además, podemos encontrar una primer fase I de ensayo clínico usando la línea celular, NK-92, modificada para expresar un CAR-CD3z-CD28 frente a HER2 contra el glioblastoma recurrente administrado de forma intratecal (CAR2BRAIN, NCT03383978) (Boyiadzis *et al.*, 2017) que está actualmente en marcha (última actualización septiembre 2020).

4.2.2 Macrófagos-CAR

Los macrófagos son otro tipo celular del sistema inmunitario innato muy interesante, con una alta penetrancia en los tumores sólidos, aunque, los macrófagos infiltrados en tumores tienen un fenotipo inmunosupresor (M2). Fuera del entorno tumoral, los macrófagos son efectores y reguladores centrales del sistema inmunitario innato, capaces de fagocitar, producir citotoxicidad celular, secretar moléculas proinflamatorias y presentar antígenos a las células T, promoviendo así la respuesta antitumoral adaptativa y mediando directamente la citotoxicidad por anticuerpos monoclonales. Varios grupos han desarrollado estrategias de inmunoterapia antitumoral utilizando ingeniería de monocitos y macrófagos (revisados por (Anderson *et al.*, 2020). Actualmente, se ha conseguido modificar macrófagos humanos autólogos, transducidos con un adenovirus como vehículo del CAR-CD3z para el tratamiento de tumores sólidos HER2+, que se encuentra en ensayo clínico fase I (NCT04660929). Estos macrófagos, de fenotipo proinflamatorio M1, consiguieron polarizar a los macrófagos M2 del TME, realizar presentación cruzada y estimular a las células T, no sólo eliminando directamente el tamaño del tumor sino también generando una respuesta adaptativa, por lo que se presenta como una alternativa muy potente a la terapia con células CAR-T (Klichinsky *et al.*, 2021).

5 RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS (CARs)

Las células CAR-T son células T derivadas del paciente (autólogas) transducidas con un vector generalmente viral que codifica para un receptor antigénico quimérico (CAR) que va a reconocer un antígeno concreto de cualquier naturaleza (peptídico, glucídico, específico de tumor, viral, etc). El reconocimiento del antígeno diana por el CAR activa a la célula T, provocando la liberación de citoquinas y lisis de las células diana de una manera independiente de presentación antigénica en MHC, por lo que puede utilizarse frente a tumores que dejan de expresar MHC como mecanismo de escape tumoral. Estas células son modificadas y expandidas *ex vivo* y reinfundidas de nuevo en el paciente tras una linfodeplección previa (**Figura 6**, CAR).

5.1 ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DE LOS CARs

Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es un receptor sintético modulable que, generalmente combina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales con la función efectora dada por diferentes dominios de señalización capaces de activar a las células T de una manera independiente de MHC (Larson and Maus, 2021a).

Estructuralmente podemos diferenciar tres dominios: un dominio extracelular (ectodominio) o de reconocimiento, un dominio transmembrana y un dominio de señalización o endodominio (**Figura 8**). El dominio extracelular está compuesto, generalmente, por un péptido líder y un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que contiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal y que determina la especificidad del CAR. Dicho dominio extracelular está unido al dominio transmembrana a través de una región espaciadora. La región transmembrana consiste en una hélice alfa hidrofóbica, generalmente procedente del receptor CD8, y determina en gran medida la estabilidad del receptor CAR. A continuación, se incluyen los dominios intracelulares que determinan la actividad y señalización de la célula T-CAR. La evolución del desarrollo de los CARs en las últimas tres décadas permite agruparlos en cinco generaciones basadas en la estructura y composición de este endodominio (**Figura 8**).

5.1.1 Evolución de las células CAR-T y funcionalidad

La **primera generación de CAR** fue desarrollada entre 1989 a 1993 por los inmunólogos Zelig Eshhar y Gideon Gross en el *Weizmann Institute of Science* (Israel) (Styczyński, 2020). El primer desarrollo fue publicado en 1989 (Gross, Waks and Eshhar, 1989), era un receptor constituido por las regiones constantes de células T (TCR) (C α y C β) fusionadas con regiones variables de inmunoglobulina (Ig), VH y VL. En este concepto "pre-CAR", la formación del dominio de reconocimiento de antígeno VH-VL requería el emparejamiento de dos

construcciones individuales, hecho que es eliminado luego en la primera versión del CAR. Así, en 1993, se publica la estructura del primer CAR (Eshhar *et al.*, 1993), denominado “T-Body”. (Braendstrup, Levine and Ruella, 2020).

Este CAR inicial incluía únicamente un dominio de señalización basado en la cadena ζ del cluster de diferenciación 3 (CD3 ζ), el cual contiene tres motivos de activación a inmunotirosina (ITAM), los cuales son fosforilados por la proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (Lck) dentro del dominio citoplásmico de CD3. El primer ensayo clínico con células CAR-T que se probó en pacientes, fue con células T que expresaban un CD4-CD3 ζ CAR para la eliminación de células CD4+ infectadas con HIV, utilizando una molécula CD4 fusionada a la cadena γ del receptor Fc (FcR γ) para redirigir las células T a gp120 en 1994 (Braendstrup, Levine and Ruella, 2020). Sin embargo, estos CAR de primera generación no lograron reducir la carga viral en pacientes durante períodos prolongados.

Al mismo tiempo se estaban desarrollando CARs frente a diversos antígenos tumorales y, a pesar del buen funcionamiento ya que esta cadena sola puede entregar una señal potente en ausencia de otros componentes del complejo TCR-CD3 (las cadenas γ , δ y ϵ), resultó en una ineficiente producción de IL-2 y por tanto, con muy baja capacidad de proliferación y efecto antitumoral *in vivo* (Eshhar *et al.*, 1993).

Poco después entre 1995-2004 (Braendstrup, Levine and Ruella, 2020), se generaron CARs de **segunda generación** que incluían un dominio coestimulador, además del CD3 ζ . Dentro de los más frecuentes podemos encontrar derivados de la familia de CD28 (CD28 e ICOS) y de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), como son CD137 (4-1BB), CD134 (OX-40) o CD27, en un intento de imitar la coestimulación que se proporciona durante el reconocimiento de TCR por las células presentadoras de antígeno (APC), mejorando así la proliferación y citotoxicidad (CD28) y/o persistencia (4-1BB) (**Figura 8**).

Se ha observado que los CAR-CD28 provocan una activación más fuerte que los CAR-4-1BB, pero menos sostenida, con un fenotipo más efector, alta producción de IL-2 y mayor capacidad citolítica. Las células CAR-CD28 son también más sensibles a niveles bajos de antígeno, en deterioro de una limitada persistencia, con mayor muerte celular inducida por activación y señalización tónica (Brentjens *et al.*, 2013). Las células CAR 4-1BB son más persistentes; con fenotipo mayoritariamente memoria central, menor agotamiento y una regulación positiva de los miembros de la familia Bcl-2.

Es probable que estos fenotipos sorprendentemente distintos surjan de la activación de diferentes vías descendentes. En las células T normales, 4-1BB normalmente inicia la señalización aguas abajo a través del reclutamiento de factores asociados a TNFR (TRAF) y con ello, las rutas de NF- κ B y MAPK quinasas; CD28, por el contrario, emite señales a través de la

vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt (Lindner *et al.*, 2020). Se presume que estas rutas se conservan en las células T con CAR, pero es posible que cuando estos dominios se colocan en el contexto de una construcción CAR, también activen otras rutas (revisado en Lindner *et al.* 2020).

Sin embargo, estas hipótesis contrastan con los resultados de Salter y colaboradores donde analizaron los eventos de señalización inducidos por estimulación de células CAR-T CD8+ humanas primarias que expresan CARs CD28/CD3 ζ o 4-1BB /CD3 ζ por espectrometría de masas (LC-MS/MS) y encontraron que ambos CARs activaban los mismos intermediarios de la señalización. Así, la estimulación de las células T CAR CD28 / CD3 ζ provocó una fosforilación más rápida e intensa de los intermediarios de señalización, además de una mayor fosforilación basal de la cadena CAR CD3 ζ y de Lck asociado a ese dominio. Por tanto, los autores concluyen que no se trata tanto de que activen vías de señalización de fosfoproteínas divergentes, sino que dichas diferencias funcionales están relacionadas más bien con la fuerza de señalización y la cinética (Salter *et al.*, 2018).

En cualquier caso, las células CD28 CAR-T se diferencian a un fenotipo más efector con un perfil metabólico glucolítico aeróbico, mientras que 4-1BB CAR-T se diferencian a un fenotipo memoria central con incremento en biogénesis mitocondrial y un metabolismo oxidativo (Kawalekar *et al.*, 2016). Según este perfil, las células 4-1BB CAR T, menos citotóxicas, pueden ser particularmente útiles para tumores de alta densidad de antígenos, mientras que las CD28-CARs pueden tener una función más relevante donde hay una densidad de antígeno de superficie baja o donde el CAR tiene un dominio de unión de baja afinidad.

De la idea de combinar las actividades complementarias de los dominios de CD28 y 41BB surgen la **tercera generación** de células CAR-T. En 2005, el equipo de Brenner incorpora dos dominios coestimuladores, con el objetivo de aumentar la potencia del CAR estimulando la producción de citoquinas. Los primeros ensayos con estas células se llevaron a cabo para tratar linfomas y cáncer de colon. Sin embargo, existe cierta controversia (Braendstrup, Levine and Ruella, 2020).

Por un lado, en un ensayo clínico con células antiCD19-CAR-T comparando las dos generaciones, la tercera generación mostró una expansión y persistencia mejorada en pacientes (Ramos *et al.*, 2018). Sin embargo, en otro estudio frente a CD22, la segunda generación fue superior (Haso *et al.*, 2013) por lo que se deduce que la eficacia de la terapia no está limitada a los dominios coestimuladores (ni tipo ni número) y que influyen otros factores como la diana, avidéz del anticuerpo y que la mejor combinación debe ser determinada para cada terapia específica. En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo clínico para comparar el uso de células CD19 CAR-T de segunda o tercera generación (NCT01853631).

La activación de las células CAR-T tras la unión al antígeno provoca un cambio conformacional en su estructura, lo que le permite reclutar a Lck inicialmente y fosforilar los dominios de señalización intracelular, formando una sinapsis inmunológica no clásica, con menor tamaño, sin generar el clúster de Lck (típico de la sinapsis inmunológica del TCR) sino con patrón más desordenado, asociado a una rápida bajada de PKC δ y a un inicio de la respuesta y separación de la célula diana más rápidos que en el caso de la sinapsis clásica del TCR (Benmebarek *et al.*, 2019).

Tras dicha activación inicial, se desencadena una reacción en cascada de señalización (que depende de los dominios intracelulares) y promueve la respuesta citotóxica a través de mecanismos sinérgicos: la exocitosis de gránulos líticos (perforina, granzima, dependiente de flujo de calcio), la expresión de ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (eje Fas/Fas-L, TRAIL, independiente de flujo de calcio) y secreción de citoquinas (como IFN γ , que puede sensibilizar a las células del estroma tumoral) (Benmebarek *et al.*, 2019).

Por otro lado, encontramos además células CAR T de cuarta o quinta generación, que están basados en los CARs de segunda generación pero que incluyen además dominios de señalización de receptores de citocinas o expresión constitutiva o inducible de citoquinas inflamatorias o proteínas relevantes, como interleuquina-12 (IL-12), IL-18, IL-15, metaloproteasas, entre otras (Lindner *et al.* 2020).

La **cuarta generación** de CARs surge de la expresión de IL-12 a la construcción del CAR de segunda generación, a través de un promotor NFAT sintético (por activación de la célula T y respuesta a IL-2) y se conocen como células T redirigidas para la muerte mediada por citoquinas universales (TRUCKs, del inglés, *T cell Redirected for Antigen-Unrestricted Cytokine initiating killing*) o CAR-armados. Esta coexpresión de IL-12 aumenta la activación de las células T, y permite además reclutar y activar células de inmunidad innata para atacar a células del cáncer antígeno-negativas (Chmielewski and Abken, 2020).

La **quinta generación** de CAR incluye un dominio truncado de la cadena beta del receptor de IL-2 citoplasmático con un sitio de unión al factor de transcripción STAT3. De modo que, cuando se activa la célula T a través del CAR, este receptor simultáneamente activa al TCR, a través del CD3z, dominio coestimulador CD28 y la vía de señalización JAK-STAT3/5, mimetizando las tres vías de activación fisiológicas intrínseca de los linfocitos T. Actualmente se está investigando su eficacia y seguridad (Kagoya *et al.*, 2018)(Tokarew *et al.*, 2019).

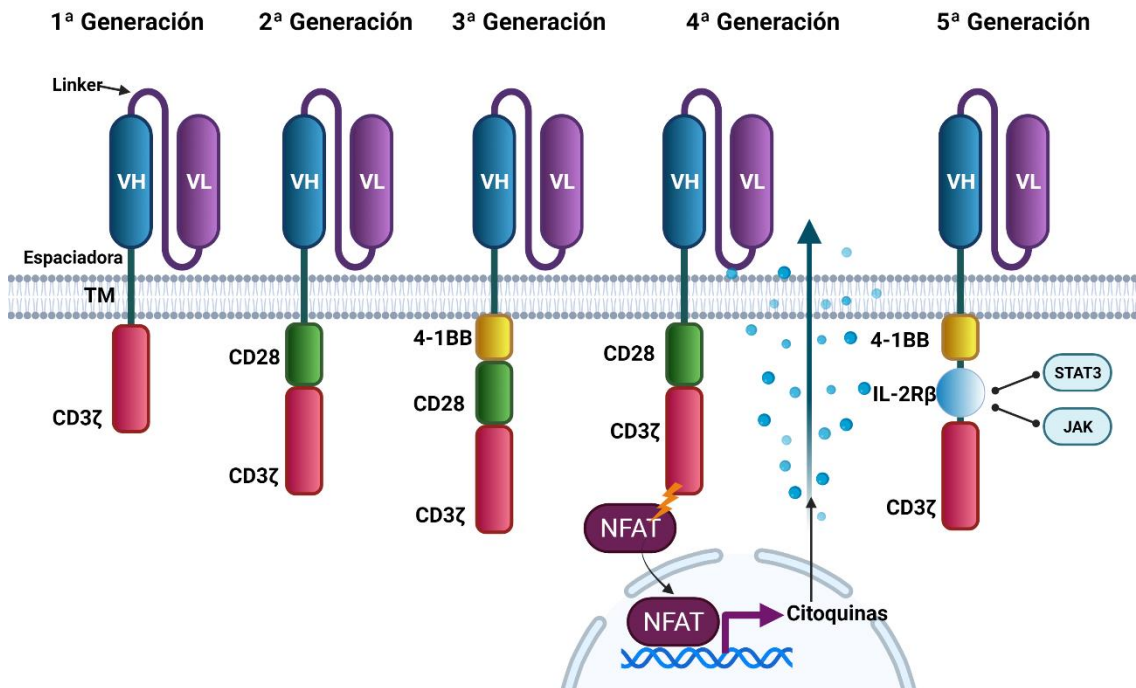


Figura 8. Estructura en las diferentes generaciones del CAR. La proteína CAR contiene un dominio de unión al antígeno extracelular (formado por VH y VL) unidos por una secuencia linker, una secuencia espaciadora, un dominio transmembrana (TM) y un dominio de señalización intracelular. El fragmento variable de cadena sencilla (scFv) reconoce a los antígenos tumorales. El dominio de señalización es un complejo de activación de células T intracelular que consta de CD3ζ y moléculas coestimuladoras, que modulan la cascada de señalización aguas abajo de la activación de células T tras la unión al antígeno. En cada nueva generación de CAR, se modifica la señalización y se añade una nueva característica. La primera generación de CAR incluía la porción scFv y el endodominio de señalización de CD3ζ. La segunda generación de CAR añadió una molécula coestimuladora (como CD28, 4-1BB o ICOS para aumentar la persistencia y eficacia). La tercera generación de CAR contiene CD3ζ y dos dominios coestimuladores (por ejemplo, CD28 y 4-1BB). La cuarta generación de CAR (también llamados TRUCKs) contienen modificaciones adicionales que permiten la expresión de diferentes citocinas de manera constitutiva o inducible por activación (a través del factor nuclear de células T activadas, NFAT). La quinta generación de CAR se basa en la segunda generación, con la adición de un fragmento del receptor β de IL-2 (IL-2Rβ) el cual tiene un sitio de unión de STAT3, y activará la señalización de citoquinas vía JAK/STAT.

5.2 NUEVOS DISEÑOS DE CÉLULAS CAR-T

Cada módulo de la estructura CAR influye en la función de la célula CAR-T tanto de forma independiente como sinérgica. Las combinaciones específicas de cada célula CAR-T son las que determinan la funcionalidad, efectividad y seguridad de esa terapia, pudiendo modular la avidéz y afinidad del ectodominio, longitud y flexibilidad de la región espaciadora, cinética y la dinámica de la activación de la vía de señalización a través de los dominios citoplasmáticos y

afectando así en mayor o menor medida a las características específicas de las células CAR-T (Jayaraman, Jayapriya, MichaP. *et al.*, 2020; Lindner *et al.*, 2020).

5.2.1 Nuevos diseños en el ectodominio

La afinidad scFv es un parámetro clave que ha sido modulado para mejorar la especificidad del CAR y que junto con la avidéz y su expresión en la superficie de la célula T, son determinantes en la reactividad del CAR y en su toxicidad, que es de particular importancia cuando el antígeno objetivo se expresa de forma ubicua en tejido sano. En el caso de los CARs comerciales, se ha utilizado un ScFv que procede de anticuerpos clínicamente validados (derivado del FMC63 frente a CD19) aunque no todos los ScFv sirven para señalar el CAR (Fujiwara *et al.*, 2020).

Un ScFv en el contexto CAR puede ser estructuralmente diferente del scFv soluble porque está anclado en las membranas de las células T mediante un dominio de bisagra y un dominio transmembrana. Los scFv son dímeros de dominios variables unidos por un péptido flexible y que se asocian mediante interacciones hidrófobas. En algunos casos, las regiones del marco hidrófobo favorecen la agregación del receptor CAR en la superficie de las células T, lo que conduce a la activación de las células T independiente del antígeno, llamada "señalización tónica", y finalmente deriva en un agotamiento prematuro de las células T y la pérdida de la eficacia de la terapia (Long *et al.*, 2015; Ajina and Maher, 2018).

Long *et al.* (2015) compararon la actividad citotóxica *in vitro e in vivo* de un anti-CD19CAR vs antiGD2-CAR, observando que, si bien generaban una respuesta *in vitro* similar, la señalización independiente de antígeno podía agotar a las células CAR-T y limitar su eficacia *in vivo*. Dicha señalización tónica tiene diversos grados dependiendo del CAR y está causada por el *clustering* o auto-agregados de CARs en la superficie celular. Además, se sabe que los scFv son sensibles al intercambio de dominios, un fenómeno en el que dos dominios variables de diferentes scFv se asocian entre sí y puede conducir a la oligomerización de CAR.

Por otro lado, existe un problema de inmunogenicidad (Larson and Maus, 2021a), ya que los ScFv son de origen murino. Complejas estrategias de humanización de los scFv consiguen reducir y/o evitar esta respuesta. Los CAR específicos de CD19 humanizados han demostrado ser efectivos en el 64% de los pacientes que recayeron después del tratamiento con CAR-T CD19 clásicos (murinos). Por otro lado, los regímenes de linfodepleción antes de la infusión de células CAR-T se han utilizado en la práctica clínica como un medio para eliminar las células inmunosupresoras han evitado la inmunogenicidad frente al ScFv murino.

Otra aproximación interesante combina el potencial de la célula CAR-T con la selectividad de la terapia con TCRs sintéticos. Las células CAR-T con scFv similares a TCR que reconocen la α -fetoproteína han mostrado fuertes efectos inhibidores de tumores en el tratamiento

del cáncer de hígado. Se han generado una plataforma de células CAR-T cuyo dominio extracelular es capaz de reconocer péptidos presentados en MHC, consiguiendo así, reconocer antígenos intracelulares que tan importantes son para la terapia frente a tumores sólidos y por otro lado, evitar emparejamiento incorrecto de TCR modificados con TCR endógenos, lo que mejoraría la seguridad (Liu *et al.*, 2017).

Además, se han generado nuevas células CAR-T con otras moléculas diferentes al ScFv como dominios de unión. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos de un solo dominio (sdAbs), nanoanticuerpos, receptores y ligandos naturales (como NKG2D, FTL3L o basados en citoquinas) u otro tipo de dominios proteicos como DARPins (revisados en Hanssens *et al.*, 2021) (**Figura 9**).

5.2.2 CARs multi-diana

Para evitar uno de los mecanismos de escape tumoral por pérdida del antígeno al que está dirigida la terapia o bien, para mejorar la seguridad ya que los antígenos pueden encontrarse en tejido sano. Podemos encontrar varias aproximaciones (**Figura 9**):

- **Pooled CAR-T:** se administran varios productos de células CAR-T al mismo paciente.
- **Multi-CARs:** estas células T expresan más de una molécula CAR en la superficie denominándose duales si co-expresan dos tipos.
- **Tandem-CARs.** En esta estrategia, el ectodominio está conformado por múltiples dominios de unión a antígenos en una sola molécula de CAR. Se han utilizado múltiples scFv, con el riesgo de un posible emparejamiento cruzado entre sí de las cadenas VL y VH de los diferentes, por lo que otras combinaciones como scFv/ ligandos naturales se han utilizado para minimizar este posible fallo en la terapia. (Kang *et al.*, 2020).

5.2.3 Células CAR-T programadas endógenamente: Split-CARs

Durante la última década, han surgido los equivalentes biológicos de las puertas lógicas booleanas OR, AND y NOT. La puerta OR está diseñada para prevenir el escape de antígeno en lugar de aumentar la especificidad, pero las puertas AND y NOT están diseñadas para incrementar la especificidad tumoral.

Sin embargo, estas estrategias tienen sus inconvenientes. Para la puerta AND, en la que la 'señal 1' (CD3 ζ) y la 'señal 2' (coestimulador) se dividen en dos CAR separados: la señal 1 por sí sola es suficiente para desencadenar la activación de los subconjuntos de células T de memoria y efectoras en el producto de ingeniería genética, mientras que la adición de la señal 2 aumenta la respuesta y permite la activación de células CAR-T (**Figura 9**). Esto implica que la pérdida de cualquiera de los antígenos diana disminuirá la actividad del producto, aumentando el riesgo de escape del tumor (Hanssens *et al.*, 2021) .

Para la puerta NOT, en la que un segundo CAR proporciona una señal supresora, es un desafío encontrar un objetivo ideal asociado con tejidos sanos que está ausente en los tumores y diseñar una señal inhibitoria suficientemente potente para el NOT (**Figura 9**).

Tales limitaciones han estimulado el diseño de un nuevo sistema lógico de proteínas y circuitos genéticos más avanzados, como el receptor Notch sintético (SynNotch, un receptor que cuando se activa, libera generalmente un factor de transcripción) y sistemas inducibles por hipoxia, en los que de tipo condicional (“IF/THEN”) por lo que el encuentro con un antígeno o condición específica induce la expresión funcional de un CAR específico de segundo antígeno que es capaz de mediar la activación completa de las células T (**Figura 9**).

5.2.4 Células T CAR Universales

Las células CAR-T universales (uCARs) constituyen otra estrategia para controlar exógenamente la actividad de las células T, abordar el problema de la pérdida de antígeno tras la terapia y los diferentes antígenos de un tumor heterogéneo. En este diseño, la parte de reconocimiento de la diana no está predefinida en el módulo del CAR. En general, estos uCARs expresan un CAR con la estructura clásica, con su dominio transmembrana y dominios intracelulares, sin embargo, el dominio extracelular suele ser una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) que se une al receptor anclado a la membrana de la célula T (como puede ser CD16, FcRIII) y al antígeno tumoral (Tokarew *et al.*, 2019).

Este abordaje permite un control externo por parte del clínico tanto en dosis como en tiempo, que dependerá de la vida media esta molécula extracelular, lo cual es una desventaja en el caso del uso de los anticuerpos, ya que tienen una vida media relativamente larga. Desafortunadamente, también podrían activarse por IgG presentes en el entorno de la célula CAR-T, por lo que los uCARs que han llegado a fase clínica I están paralizados por la FDA por temas de seguridad.

Para evitar esto, han diseñado otras estructuras basadas en múltiples y diversas interacciones como puede ser basadas en avidina-biotina, anticuerpos anti-FITC, o anti- péptido, entre otras (revisadas en Liu, Zhao and Song, 2019; Hanssens *et al.*, 2021).

SUPRA-CARs

Una de las versiones más elegantes de los uCAR son los SUPRA-CAR (del inglés, *Split-Universal-Programmable CAR*): CARs ajustables y programables que permiten regular la actividad de la célula CAR-T. Este SUPRA-CAR está basado en la interacción de las proteínas cremallera de leucina, (ZIP, del inglés *leucine zipper*), por lo que tendremos un módulo zip-CAR y otro módulo zip-Fv, y que simplemente cambiando este zip-Fv (**Figura 9**). permite activarse por múltiples antígenos tumorales, modular la afinidad de dichas cremalleras y con ello, la

actividad de la célula SUPRA-CAR-T y permitir todas las combinaciones de puertas lógicas AND y OR (Cho, Collins and Wong, 2018). Las células SUPR-CAR-T activadas también podrían desactivarse cuando sea necesario añadiendo un zipFv competitivo que no contenga scFv de unión a antígeno.

La eficacia de este sistema ha sido demostrada *in vitro* en *in vivo* en modelos murinos de leucemia y tumor sólido, y es necesario un ensayo clínico para confirmar el vasto potencial de estas células SUPRA-CAR-T (Cho, Collins and Wong, 2018).

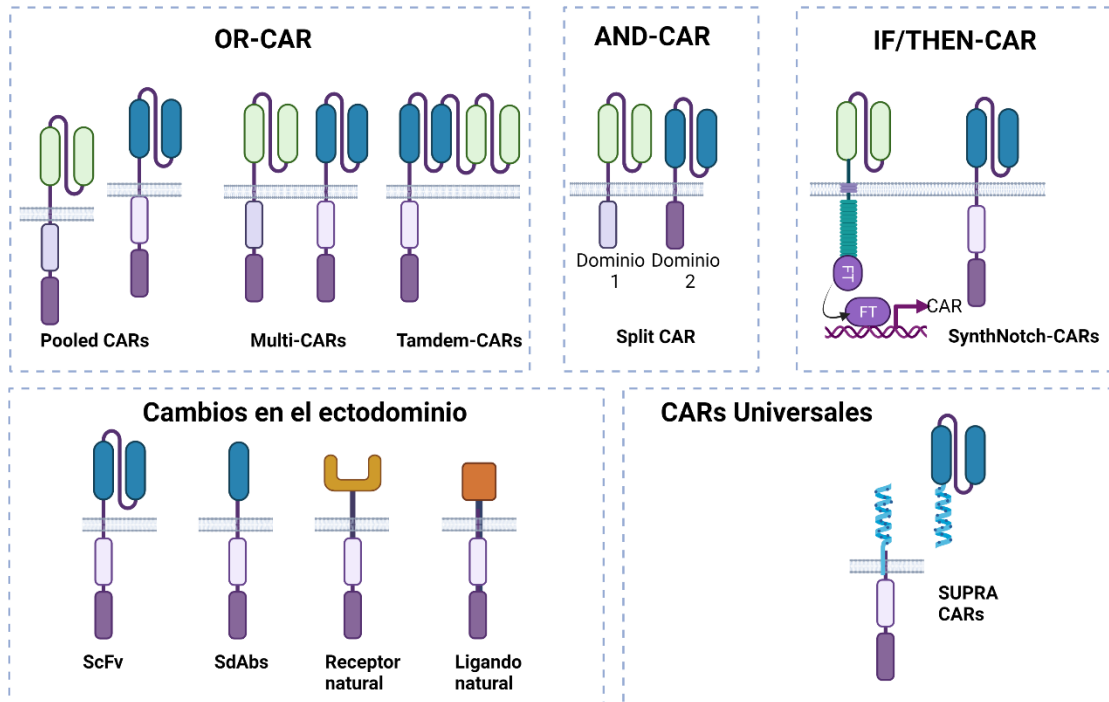


Figura 9. Representación de los nuevos diseños de CARs más relevantes. Arriba, izquierda. OR-CAR: la célula CAR-T se activa cuando uno de los dos antígenos esté presente. *Pooled* (dos tipos de células CAR-T diferentes), *Multi-CARs*: la misma célula expresa dos tipos de CAR. *Tandem*: expresa dos ScFv que pueden activar a la célula CAR-T. *AND-CAR*: sólo cuando estén presentes los dos antígenos, se activaría la célula CAR-T. *IF/Then*: Si está un antígeno, la célula CAR-T expresa el CAR. Abajo, izquierda: diferentes variaciones de CAR-T cambiando el ectodominio. Abajo, derecha: CARs-Universales. Han sido ingenierizados para poder modular la respuesta frente a cualquier antígeno añadiendo un adaptador específico.

6 HERRAMIENTAS DE TERAPIA GÉNICA PARA GENERAR Y OPTIMIZAR LAS CÉLULAS CAR-T

En los diferentes desarrollos de ingeniería de linfocitos o de inmunoterapia génica, se requieren de herramientas de modificación genética eficaces y seguras que sean capaces de introducir el material genético de interés dentro de las células primarias, como lo son linfocitos T y células NKs, principalmente. Es por tanto, una disciplina de estudio de la terapia génica, la cual persigue la cura o control de enfermedades mediante la modificación genética de diferentes células diana.

La terapia génica puede ser *ex vivo* o *in vivo* y va a entregar el material genético a través de diferentes vehículos denominados vectores, pudiendo clasificarlos como vectores virales y no virales. Actualmente la ingeniería de linfocitos se centra principalmente en estrategias *ex vivo*, aunque algunos grupos trabajan en desarrollar estrategias *in vivo* (Mhaidly and Verhoeven, 2019) y utilizando vectores retrovirales, aunque también existen desarrollos utilizando vectores no virales (Monjezi *et al.*, 2017).

El campo de la terapia génica ha ido desarrollando multitud de herramientas con la finalidad de curar patologías tan diferentes como el SIDA, cáncer, enfermedades monogénicas o enfermedades cardiovasculares. Diferentes patologías requieren modificación genética de diferentes tipos celulares y con diferentes finalidades.

Esto se ha traducido en el gran arsenal de herramientas de las que disponemos actualmente, que permite modificar de manera eficiente y segura la práctica totalidad de las células diana de interés. Esta “caja de herramientas” con diferentes opciones de vectores permite el diseño óptimo de una estrategia adecuada, eficaz y segura dependiendo del objetivo de la terapia y la fisiopatología de la enfermedad

En la presente tesis se hará uso de *esta caja de herramientas*, en las que el grupo lleva trabajando muchos años y donde se han desarrollado varias patentes, para intentar mejorar la eficacia y seguridad de las células CAR-T. A continuación, describimos las herramientas de las que se dispone para la ingeniería de linfocitos que incluyen vectores virales y no virales junto a las herramientas de edición genómica, para poder entender así los desarrollos que se realizarán en la Tesis, así como su posible aplicación en combinación con otras estrategias.

6.1 VECTORES VIRALES

Los vectores virales utilizan la capacidad natural de diferentes virus de introducir su material genético en las células que infectan. Estos virus son “domados” para que, en lugar de su material genético, introduzcan en la célula diana el gen/es terapéutico/s. Al eliminar los genes virales, las partículas del vector viral no son infectivas, por lo tanto, no *infectan*, sino que

transducen la célula diana y lo hacen de una manera muy eficiente. Esta característica ha llevado a estrategias extensas para diseñar vectores virales recombinantes para la entrega de genes terapéuticos de manera eficaz y segura-

En general, un vector viral está compuesto por tres componentes y varían para cada plataforma viral:

1. Cápside y/o envuelta que encapsida el material genético y define el tropismo (el tipo celular a modificar).
2. Transgén de interés que se va a expresar en las células diana.
3. Casete regulador de expresión y empaquetamiento: contiene los elementos como el *enhancer* (potenciador), promotor, y elementos auxiliares necesarios para que se empaquete en la partícula viral, se exprese y/o integre en las células diana.

A continuación, nos centraremos en describir aquellos que más se han utilizado en la ingeniería de linfocitos: los vectores retrovirales.

6.1.1 Vectores retrovirales: γ -retrovirales vs lentivirales

Dentro de los vectores retrovirales, destacan los vectores γ -retrovirales que derivan del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV, MMLV, MuLV o MLV) o del virus de células madre murinas (MSCV) y los vectores lentivirales (VLs) que proceden, principalmente, del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Milone and O'Doherty, 2018).

Los virus de la familia *Retroviridae* se caracterizan por su genoma de ARN, que se retrotranscribe al ADN por la enzima transcriptasa inversa. Este ADN se integra en el genoma de la célula huésped, lo que permite la expresión del gen de interés a largo plazo tanto en las células infectadas y su progenie. Esta característica es preservada en los vectores retrovirales, lo cual los convierte en herramientas muy atractivas para una expresión estable cuando las células se dividen activamente. En comparación con los VLs, los γ -RVs tienen la desventaja de que sólo pueden modificar células que están en división (deben acceder al genoma del huésped durante la mitosis, cuando se desmonta la envoltura nuclear), mientras que los VLs infectan de la misma manera células quiescentes o con baja división, que aquellas con alta actividad proliferativa (los VLs pueden acceder al núcleo mediante el transporte activo a través del poro nuclear por lo que no necesitan que estén en división para transducirlas).

Como se mencionó anteriormente, los vectores virales están compuestos por **tres componentes** que, en el caso de los vectores retrovirales son:

1. Una membrana lipídica, procedente de la célula empaquetadora y que contiene a la proteína de la envuelta *Env* que le confiere el tropismo al vector.
2. Un núcleo proteínico compuesto por todas las proteínas estructurales (cápside, nucleocápside, etc) y funcionales (transcriptasa inversa e integrasa).
3. El material genético que contiene los elementos necesarios para el empaquetamiento en la partícula, el proceso de transcripción en reverso y la integración en el cromosoma de la célula diana, además de un promotor y el gen/es de interés (GOI, del inglés *Gene Of Interest*).

Con esto en cuenta, para la **generación de los vectores retrovirales** se utilizan células empaquetadoras, las cuales actuarán como *fábricas de partículas virales*, al ensamblar los diferentes componentes del vector y aportar, además, la membrana del virus. Para su producción se procede a *transfectar* las células empaquetadoras (generalmente células 293T) con 3 ó 4 plásmidos, dependiendo de la generación. Se utilizan los siguientes plásmidos:

1. Plásmido de la envuelta: expresa la proteína de la envuelta seleccionada (a menudo VSV-G),
2. Plásmido/s de empaquetamiento: que contiene los genes necesarios para el empaquetamiento (gag-pol, rev y tat en 1 plásmido para los vectores de segunda generación y en dos para la tercera generación, sin tat)
3. Vector de interés: contiene el ARNm que incluye la señal de empaquetamiento (Ψ), las señales para la transcripción inversa e integración, el promotor y el GOI.

La proteína de la envuelta más utilizada, VSV-G (la glicoproteína G de la envoltura fusogénica del virus de la estomatitis vesicular), reconoce un receptor expresado de forma ubicua que fue identificado más recientemente como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo que hace que tenga un amplio tropismo por diferentes tipos celulares. Sin embargo, los VL-VSV-G no son eficaces para la transducción de células T en reposo, por lo que requiere de una activación previa con citoquinas y/o vía TCR (Amirache *et al.*, 2014). Otras envueltas ampliamente utilizadas son las derivadas del virus de leucemia murino anfotrópico (del inglés, *amphotropic murine leukemia virus* aMLV) y del virus de la leucemia del mono gibón, (del inglés, *gibbon ape leukemia virus* GaLV).

El plásmido vector (el que expresa el ARN que se va a empaquetar en la partícula viral) de interés tiene que tener una arquitectura adecuada: el promotor y el GOI deben estar flanqueado por dos LTR (*Long terminal repeats*) en 5' y en 3'. Otros elementos clave son la señal de empaquetamiento (Ψ), el cual permite la encapsidación del ARN viral durante el ensamblaje de la partícula viral y finalmente secuencias claves para la transcripción inversa y la integración.

En el caso de los vectores autoinactivados (SIN, del inglés *self-inactivating*, se introdujeron deleciones en el U3 del 3'LTR por lo que, una vez que se ha integrado el genoma

dentro de la célula diana y por el proceso de retrotranscripción, tendremos dos LTR sin la región U3, la cual contiene la secuencia promotora/*enhancer* del LTR. (Milone and O'Doherty, 2018). Además, en los VLs de tercera generación o clínicos, se elimina el requerimiento de Tat (regulador transcripcional) y se utiliza un 5'LTR quimérico, eliminando el U3 e incluyendo un promotor fuerte como puede ser CMV para la expresión del ARNm del vector en las células empaquetadoras.

La **integración en las células**, en la mayoría de los retrovirus no es del todo aleatorio, con una preferencia común por sitios activos de la cromatina. Los γ -RVs tienen preferencia por sitios cercanos al inicio de transcripción, los VLs lo hacen de manera homogénea en las zonas transcripcionalmente activas (Recchia *et al.*, 2007).

Los vectores γ -retrovirales se utilizaron para los primeros ensayos con células TILs modificadas con un γ -RV a finales de la década de 1990 (Rosenberg *et al.*, 1990) y en el primer ensayo clínico con células CAR-T, frente a CD4 para el tratamiento de pacientes VIH+ en 1994 (Mitsuyasu *et al.*, 2000)(Braendstrup, Levine and Ruella, 2020). De hecho, actualmente hay dos productos CAR-T aprobados por la FDA (Yescarta y Tecartus). Sin embargo, los vectores lentivirales se han convertido desde entonces en el virus de elección para muchos laboratorios, debido a su mayor eficiencia de transducción y expresión transgénica en las células T y seguridad como se refleja en los cuatro ATMPs generados por vectores lentivirales: tres de células CAR-T (Kymriah, Breyanzi y Abecma) y uno de células CD34+ autólogas que codifica el gen de β A-T87Q-globina (Zynteglo).

La **seguridad de los vectores lentivirales** para modificación genética de las células T (Marcucci *et al.*, 2018) queda muy patente en el mayor ensayo clínico “natural”, y es que, hasta la fecha, ningún paciente con SIDA, infectado con VIH, ha desarrollado una leucemia de células T como consecuencia de inserción preferencial del propio virus. Este hecho, se corrobora por los resultados clínicos que se tiene en el campo de la ingeniería de linfocitos, con más de 10 años de experiencia modificando células T (tanto para terapia CAR como para expresar un TCR sintético de tumor NY-ESO-1, MART-1, WT-1, en fase I/II) (Milone and O'Doherty, 2018; Braendstrup, Levine and Ruella, 2020).

Sin embargo, la inserción de los VLs puede interrumpir genes, que pueden ser deletéreos o, al contrario, ofrecer una ventaja terapéutica. Es el caso de un paciente con leucemia linfocítica crónica que participaba en un ensayo clínico de células T-CAR CD19 en el que se le detectó una población clonal de CAR-T (94% de las células T de sangre periférica derivaban de un solo clon) que era la responsable de su remisión. Al analizar el sitio de inserción, ésta ocurrió dentro del locus de la metilcitosina dioxigenasa TET2, lo que provocó la pérdida de la función del gen. Esta

interrupción hizo que las células CAR-T se mantuvieran en un fenotipo de memoria central, exhibiendo un mayor crecimiento *in vitro* y mayor secreción de citoquinas. Afortunadamente, la expansión clonal masiva remitió hasta niveles basales, revelando una potencial diana terapéutica y un aspecto interesante para analizar entre respondedores y no respondedores de la terapia CAR-T (Fraietta *et al.*, 2018).

6.1.1.1 Eficacia y estabilidad de la expresión

En cuanto a eficacia, tanto los γ -RV como los VLs generan muy buenos porcentajes de transducción y una alta estabilidad de expresión que dependen más del promotor utilizado y del GOI que del tipo de vector retroviral utilizado (Vargas *et al.*, 2016)

En el contexto de ingeniería de linfocitos, la expresión del CAR o del TCR específico dada por los γ -RV no SIN (que utilizan el promotor viral del LTR para expresar el CAR) va a ser muy alta, lo cual es necesario para aquellos CAR o TCR de baja afinidad, o una baja expresión antigénica que va a requerir de una máxima expresión del receptor terapéutico. Sin embargo, una expresión exacerbada y no regulada del CAR puede conducir al agotamiento de las células T (Eyquem *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2021a) y puede hacer que el CAR sea más reactivo contra tejido sano de baja expresión. Por lo tanto, generar una expresión del CAR más regulada permitirá generar células CAR-T con mejor capacidad antitumoral. Para ello, se dispone de todo un arsenal de vectores γ -RV y VLs autoinactivados (SIN) que incorporan diferentes tipos de promotores que pueden aplicarse de manera distinta en función del tipo de CAR y/o tipo tumoral (Gomes-Silva *et al.*, 2017).

6.2 EDICIÓN GENÓMICA EN INGENIERÍA DE LINFOCITOS

La edición genómica es un conjunto de técnicas que permiten re-escribir el genoma y que está revolucionando los campos de la biotecnología y la biomedicina. Con estas técnicas es ya posible eliminar uno o varios genes o incluso reparar mutaciones concretas de manera muy eficaz y segura. Estas herramientas, basadas en diversas nucleasas específicas como las nucleasas dedos de zinc (ZFNs), TALENs o CRISPR/Cas, están siendo también aplicadas a la ingeniería de linfocitos con diferentes finalidades:

Generación de células T alogénicas (TCRko). La gran mayoría de los desarrollos de ingeniería de linfocitos consisten en terapias personalizadas, autólogas, por lo que supone también un alto coste, un largo tiempo de producción (entre 3 y 4 semanas) que depende del estado de los linfocitos T, los cuales se suelen encontrar muy agotados tanto por la enfermedad como por los tratamientos previos, con baja capacidad de expansión, generando así un producto subóptimo.

Una de las alternativas a la terapia autóloga consistiría células T-CARs alogénicas; eliminando el TCR mediante herramientas de edición genómica. Estas estrategias pretenden generar una terapia “*off-the-shelf*”, es decir, generar un banco de células CAR-T alogénicas procedentes de donante sano, con diferentes tipos de HLAs que abarquen a la gran mayoría de la población y estén listas para ser inoculadas en cualquier momento que se necesite. En esa dirección ya existen bancos de células T específicas para ciertos virus, situación que podría aplicarse con las células CAR-T, como es el caso de células CAR-T frente a CD123 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) que además son específicas para ciertos virus que suelen causar la muerte en los pacientes de LMA (Li *et al.*, 2019).

Células CAR-T resistentes a diferentes mecanismos de inmuno-supresión. Las herramientas de edición genómica han sido también muy útiles para conferir nuevas propiedades a las células CAR-T, no sólo evitar una potencial enfermedad de injerto contra huésped sino también para evitar inmunosupresión e incrementar la persistencia realizando el *knock-out* de diferentes moléculas como PD-1/PD-L1, CTLA-4, LAG-3, receptor de adenosina A2 o receptor de TGF-beta, TGFBR2, entre otras (Pavlovic *et al.*, 2020).

Actualmente en ensayo clínico fase I podemos encontrar células CAR-T “universales” frente a CD19 y CD123, denominadas UCART19 (en fase I/II) y UCART123, respectivamente, generadas con TALENs para eliminar las moléculas del TCR y CD52 (importante para deplecionar los linfocitos previos del paciente) en el primer CAR y sólo TCR en el segundo producto (ambos de Cellectis). Además, utilizando CRISPR/Cas9, se han generado células CAR-T frente a CD19 y combinaciones con CD20 y CD22 eliminando TCR y/o B2M frente a linfomas y células universales CAR-T anti-mesotelina para tumores sólidos, eliminando también PD-1 (Chinese People’s Liberation Army General Hospital) (revisado en Depil *et al.*, 2020). Por otro lado, el primer ensayo fase I utilizando CRISPR/Cas9 (2020), utilizó células T con TCR sintético frente al antígeno tumoral NY-ESO-1, eliminando además el TCR y PD-1 (Stadtmauer *et al.*, 2020).

Sin embargo, a pesar de que el uso de herramientas genómicas para la edición de células abre un enorme abanico de posibilidades, especialmente gracias a la versatilidad y eficacia de CRISPR/Cas9, el uso de herramientas de edición genómica no está exento de efectos secundarios (como grandes deleciones o posibles recombinaciones cromosómicas al eliminar varias dianas al mismo tiempo) que pueden comprometer seriamente la viabilidad y seguridad de la terapia, y que deberían caracterizarse y evaluarse exhaustivamente ante dicha posibilidad (Qasim *et al.*, 2017; Kosicki, Tomberg and Bradley, 2018).

7 TERAPIA CAR-T PARA NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Actualmente, la inmunoterapia utilizando células CAR-T se ha convertido en una estrategia muy prometedora para el tratamiento del cáncer, especialmente para leucemias linfoides de tipo B refractarios y/o recidivantes, como se enfatiza con cinco medicamentos de Terapia Avanzada (ATMP) oficialmente autorizados.

No es sorprendente que las células CAR-T se hayan dirigido inicialmente al tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, dada la extensión de antígenos de superficie conocidos expresados en estos tipos de cánceres, así como la relativa facilidad de seguimiento del tumor y la preferencia natural de migración de las células T a órganos hematológicos, como son la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos (Maus *et al.*, 2014).

La terapia con CAR-T frente a tumores sólidos aún constituye un reto. Frente a los más de 900 ensayos clínicos frente a tumores hematológicos, sólo hay 320 ensayos contra tumores sólidos (ClinicalTrial.gov, acceso junio 2021), y ningún producto CAR-T aprobado, debido a que hay más barreras que superar. Entre estas limitaciones, las más importantes son la heterogeneidad antigénica de cada tumor y paciente, lo que deriva en la dificultad de encontrar diversas dianas comunes, el potente microambiente inmunosupresor (TME) y el acceso limitado de las células CAR-T al tumor.

Tras los primeros diseños y modificaciones genéticas de células T con CARs en los inicios de los años 1990, el primer ensayo clínico para tratar pacientes con un CAR de segunda generación no fue hasta 2011-2012, en el Children's Hospital de Philadelphia junto con la Universidad de Pensilvania. Liderado por el inmunólogo Carl June, se generaron células CAR-T autólogas frente al antígeno CD19 procedentes de los PBMCs de una paciente de 7 años con una LLA refractaria, recidivante y ya desahuciada (Braendstrup, Levine and Ruella, 2020). Fue la primera vez que, a pesar de todos los efectos secundarios graves, Emily Whitehead, consiguió una remisión completa hasta el día de hoy, hace nueve años, con lo que actualmente conocemos como Kymriah.

7.1 CÉLULAS CAR-T COMERCIALES: INDICACIONES, ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

A día de hoy, podemos encontrar cinco productos CAR-T que han sido aprobados desde 2017 como medicamentos de terapias avanzadas tanto por la FDA como por la EMA: tisagenlecleucel (tisa-cel, Kymriah, Novartis), axicabtagene ciloleucel (axi-cel, Yescarta, Kite-Gilead), brexucabtagene autoleucel (brexu-cel, Tecartus, Kite-Gilead) y lisocabtagene maraleucel (liso-cel, Breyanzi, Bristol Myers Squibb) dirigidos frente al antígeno CD19 para el tratamiento

de neoplasias de linaje B refractarias, mientras que idecabtagene vicleucel (Abecma, Bristol Myers Squibb) ha sido aprobado frente al antígeno BCMA en mieloma múltiple refractario.

A principios de este 2021, un CAR de desarrollo académico por investigadores del Hospital Clínic en Barcelona (Castella *et al.*, 2019, 2020; Ortíz-Maldonado *et al.*, 2021) ha sido aprobado por la Agencia Española del Medicamento (AEMPs) para el tratamiento de LLA. Se trata del producto ARI-0001, siendo el primer CAR académico en ser aprobado en el mundo y además, el primer y único producto CAR-T indicado para mayores de 25 años.

Todos los ATMPs comerciales, excepto Abecma, están dirigidos frente el pan-antígeno CD19 de células B. Se trata de una glicoproteína de 95kDa que junto con CD21 y CD81 actúa como co-receptor del receptor de la célula B (BCR) y está presente en el 100% de todos los tumores hematológicos tipo B, como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y otros linfomas No-Hodgkin (LNH), con un patrón más amplio que CD20 o CD22, lo que la coloca como una diana muy atractiva para la tecnología CAR (**Figura 2**). En ocasiones se utiliza tras el tratamiento con Rituximab (mAb anti-CD20), siendo tumores con pérdida de dicho antígeno (ver **Tabla 4**). Sin embargo, CD19 es una proteína necesaria para el desarrollo de células B normales y la transducción de señales.

Tabla 5. Año de aprobación del uso del ATMP-CAR-T frente a los diferentes tumores hematológicos CD19+ por una agencia reguladora.

Tumor CD19+	Kymriah	Yescarta	Tecartus	Breyanzi	ARI-001
LLA-B	2017	2017			2021
LDCGB	2018	2017		2021	
Linfoma de mediastino		2017			
LF	2018	2021		2021	
LCM			2020		

A continuación, describiremos brevemente los diferentes ATMP-CAR en cuanto a composición, indicación terapéutica y la eficacia obtenida (**Tabla 6**). Sin embargo, y desafortunadamente, estos productos no están exentos de causar efectos secundarios graves, y en algunos casos, provocando la muerte o complicaciones que deben ser tratadas durante toda la vida, como veremos más adelante (ver apartado 7.3.1).

Kymriah. Gracias a los resultados tan prometedores en los primeros ensayos clínicos denominados ELIANA, la FDA aprobó en 2017 el primer CAR anti-CD19 (CTL019, Tisangeleucel), desarrollado por la Universidad de Pensilvania en colaboración con Novartis, para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos mayores de 3 años y jóvenes adultos hasta 25 años, post-transplante o en recaída. Kymriah fue aprobada también por la EMA y en mayo de 2018 para el tratamiento de linfoma refractarios y recidivantes, tras el

ensayo clínico JULIET (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios-Kymriah, 2018).

Kymriah es un producto autólogo de células T/ células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) modificadas *ex vivo* utilizando un vector lentiviral autoinactivado con envuelta VSV-G, que codifica para un CAR antiCD19 de segunda generación (clon FMC63) con el dominio coestimulador 4-1BB (**Tabla 6**). Se utiliza el promotor EF1 α para expresar el CAR en las células T modificadas. El tiempo de manufactura es de aproximadamente 22 días y cuesta entre 375-475 000 \$ dependiendo de si el tratamiento es para un paciente con LLA o LDCBG, ya que las dosis requeridas son diferentes: para el primer caso, dependiendo del peso, hasta un máximo de 0,1 a 2,5 x 10⁸ de células T CAR-positivas viables, mientras que una dosis 0,6 a 6 x 10⁸ células T CAR-positivas viables es necesario para los pacientes con linfoma.

La administración de Kymriah ha reportado una remisión completa en el 62% de los pacientes LLA y en el 40% de los pacientes LDCGB, detectando células CAR-T entre 2-9 años en la sangre periférica de los pacientes (AEMPs).

Yescarta. Axicabtagene ciloleucel, Axi-cel o KTE-019, ha sido desarrollado por Kite-Pharma y aprobado en octubre de 2017 por la FDA como una inmunoterapia de células T/PBMCs autólogas modificadas genéticamente con un vector γ -RV pseudotipado con V-Gal para expresar un CAR antiCD19 (clon FMC63) y dominio coestimulador, región bisagra y transmembrana de CD28. Dicho CAR se expresa bajo un promotor viral, el MSCV. El tiempo de generación de este producto es aproximadamente de 17 días con un coste de 373,000\$ utilizando únicamente una aféresis fresca (no congelada). La administración de Yescarta ha generado remisiones completas en el 39%-74% para LNH y LF, respectivamente en el ensayo clínico ZUMA-1, con una persistencia en los pacientes de 3 meses y dosis en el intervalo de 1 x 10⁶ – 2 x 10⁶ células CAR+/kg de peso (AEMPs, Ficha Técnica Yescarta). Ha sido recientemente aprobado en China (23 junio 2021) como la primera terapia comercial con células CAR-T.

Tecartus. Brexu-cel, o académicamente conocido como JCAR017, ha sido también desarrollado por Kite-Gilead como una mejora de Yescarta en el ensayo ZUMA-3 frente a linfoma de manto, aprobado para su uso en 2020. Tanto el vector γ -RV como la estructura del CAR son idénticos a Yescarta, aunque se hace una selección previa de células CD4 y CD8 antes de la transducción con las partículas virales, mientras que en la generación de Yescarta se modifican directamente PBMCs. Se utiliza una dosis de 2 x 10⁶ células T viables positivas para CAR por kg de peso corporal, con un máximo de 2 x 10⁸ células T viables positivas para CAR consiguiendo una remisión completa en el 62% de los pacientes con una detección en los pacientes de entre 3 a 24 meses (Ficha Técnica Tecartus, EMA).

Breyanzi, Lisocabtagene maraleucel, desarrollado por Bristol Squibb Meyers y recientemente autorizado este 2021, es un producto de células T autólogas, de composición definida de células T CD4 y CD8 purificadas (criopreservadas por separado e inoculadas juntas) que expresan el CAR anti-CD19 (clon FMC63), región bisagra de IgG4, dominio transmembrana CD28 y 4-1BB como dominio co-estimulador, en el contexto de un SIN-VL con envuelta de VSV-G. Además, incluye la expresión de un marcador de seguridad y selección, el receptor de factor de crecimiento epidérmico EGFR truncado (tEGFR), para que las células CAR-T puedan ser deplecionadas con el anticuerpo Cetuximab en caso de toxicidad tras la infusión. Administrando dosis de 50 a 110×10^6 células T viables positivas para CAR (que constan de células T viables positivas para CAR 1: 1 de los componentes CD8 y CD4) se está obteniendo una remisión completa en el 54% de los pacientes y una durabilidad de 2 años por ahora (Ficha técnica Breyanzi, AEMPs).

ARI-001. En marzo de 2021, la AEMPS aprueba el uso del CAR-T ARI-0001, como medicamento de terapia avanzada de fabricación no industrial desarrollado por el Hospital Clínic junto a la promoción del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Es el primer CAR de desarrollo académico que ha sido aprobado en Europa y el único aprobado para la LLA refractarios/recidivantes en pacientes mayores de 25 años, generando un 70% de remisiones completas frente a LLA y 50% frente a LNH. Este producto consiste en células T autólogas, muy similar a Kymriah, pero modificando células T aisladas (CD4 y CD8) e utilizando un scFV frente a CD19 de desarrollo propio (clon A3B1) y dominio transmembrana y bisagra de CD8.

Este CAR debe su nombre a Ari Benedé, una joven paciente con LLA que murió a los 18 años en 2016 y que, gracias a ella y su madre, propulsaron la investigación de la terapia con células CAR-T para conseguir implantarla en España, entonces sólo disponible en EEUU.

En el ensayo clínico CART19-BE-01 (Ortíz-Maldonado *et al.*, 2021), donde se han incluido pacientes con ALL, pero también con LNH y 1 paciente con LLC, prueban inocular la dosis en tres partes: un 10% a día 0 y 30% y 60% en las segunda y tercera fracción con la intención de minimizar y controlar mejor uno de los efectos secundarios más graves, la tormenta de citoquinas o CRS. Actualmente se está ensayando frente a mieloma múltiple.

Tabla 6. Comparativa de las características estructurales/técnicas de los diferentes ATMPs aprobados.

ATMP:	Kymriah	Yescarta	Tecartus	Breyanzi	ARI-001
ScFv (clon)	FMC63	FMC63	FMC63	FMC63	A3B1
Bisagra y TM	CD8a	CD28	CD28	IgG4/CD28	CD8a
Co-estimulación	CD3z-41BB	CD3z-CD28	CD3z-CD28	CD3z-41BB	CD3z-41BB
Formulación	PBMCs	PBMCs	Células T (CD4+ y CD8+)	Células T CD4:CD8 (ratio 1:1)	Células T (CD4+ y CD8+)
Vector	SIN-VL	γ -RV	γ -RV	VL	VL
Promotor	EF1 α	MSCV	MSCV	EF1 α	EF1 α
Envuelta	VSV-G	GaLV	GaLV	VSV-G	VSV-G
Otros elementos	-	-	-	tEGFR	-
Persistencia	1-9 años	3 meses	3-24 meses	2 años	ND
Respuesta Completa	LLA LNH: 40%	LNH:39% LF:74%	62%	54%	LLA:70% LNH: 50%
Ensayo clínico	ELIANA/ JULIET	ZUMA-1	ZUMA-2	TRANSCEND	CART19- BE-01
Tiempo manufactura⁺	22 días	19 días	15 días	24 días	10 días
Coste	475,000 - 373,000 \$	373,000\$	373,000\$	\$410,300	90 000 -100 000 €*

+, Los tiempos pueden variar dependiendo del paciente. *Precio de coste, estimado. LLA: leucemia linfoblástica aguda. LNH: linfoma No-Hodgkin. LF: linfoma folicular. PBMCs: células mononucleares procedentes de sangre periférica.

7.2 GENERACIÓN Y MANUFACTURA DE CÉLULAS CAR-T A GRAN ESCALA DE GRADO CLÍNICO

Parte del éxito de la terapia radica en conseguir la adecuada transducción y expansión de las células del paciente, el cual es a menudo, un paciente muy castigado con uno o varios tratamientos previos además de un periodo de tiempo considerable luchando contra el cáncer por lo que su sistema inmunitario puede verse comprometido y a veces, no se ha alcanzado un número suficiente de células CAR-T necesarias para el tratamiento, o el paciente ha fallecido en el tiempo de producción y manufactura (10-20% de los pacientes que se someten a la leucoféresis, Bersenev, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

El proceso de manufactura comienza con una leucoféresis de sangre periférica. A continuación, se pueden separar los PBMCs o los linfocitos T (con bolitas magnéticas antiCD4 y antiCD8, con una mayor pureza y eliminado células inhibitoras y contaminantes (Terry Fry, NCBI)), y son activados *ex vivo* durante 48h con antiCD3/CD28 en presencia de un cóctel de citoquinas (IL-2 o IL7/IL-15). Aunque no hay un protocolo concreto aprobado por la FDA, el cultivo con IL7/15 han dado mejor eficacia terapéutica al tener un producto menos diferenciado, más memoria (Gargett and Brown, 2015; Roddie *et al.*, 2019)

Posteriormente, las células T o PBMCs se modifican con vectores y se expanden en un biorreactor entre 7-11 días hasta alcanzar un número de células establecido. Se obtendrá un producto mixto con células CAR+ y CAR-, policlonal desde un punto de vista del TCR, con una cierta proporción de CD4 y CD8 y un fenotipo más indiferenciado, memoria o efector dependiendo del material de partida. A continuación, se realizan los análisis pertinentes de caracterización y control microbiológico e inmunológico como corresponde a un producto GMP con vectores virales (como número de copias integradas por genoma, presencia de partículas virales replicantes o presencia de VSV-G libre) (Roddie *et al.*, 2019; Castella *et al.*, 2020)

Durante ese periodo de producción, el paciente es linfodeplecionado en régimen de quimioterapia preventiva (con ciclofosfamida/fludarabina) lo que, por un lado reduce la posibilidad de desarrollar el síndrome de lisis tumoral, al reducir la cantidad de células tumorales y por otro, favorecerá la expansión *in vivo* de las células CAR-T administradas (evita la competencia de las células T y las células CAR-T por las citoquinas), eliminando también la presencia de células T reguladoras, que puedan comprometer la terapia (Gattinoni *et al.*, 2005). El paciente recibirá generalmente una sola dosis, aunque a veces pueden ser administradas en varias (ensayo clínico ARI, Ortíz-Maldonado *et al.*, 2021).

A lo largo de los años, se ha evolucionado de un cultivo estático de las células CAR-T y manual, semicerrados (G-Rex) a utilizar dispositivos/biorreactores cerrados y automáticos que no requieren una sala blanca para la producción de células CAR-T, como es el caso del biorreactor CliniMACS Prodigy (Zhang *et al.*, 2018; Roddie *et al.*, 2019).

7.3 LIMITACIONES DE LAS TERAPIAS CAR-T FRENTE A CD19

A pesar de los resultados tan increíbles con las terapias CAR-T frente a CD19, existen efectos secundarios tóxicos muy graves que, en ocasiones, han provocado la muerte de pacientes. Por otro lado, existen ciertas limitaciones de las propias terapias que comprometen la eficacia que, sumado a los mecanismos de escape tumoral hace que un 40-60% de los pacientes tratados con célula CAR-T no alcancen remisiones completas a largo plazo.

7.3.1 Limitaciones de las terapias CAR-T frente a CD19: efectos secundarios

Respecto a las toxicidades tanto a corto como a largo plazo, podemos clasificarlas en *on-target/on-tumor* (resultado directo de la acción del CAR sobre la diana) y *on-target/off-tumor* (interacción del CAR con su antígeno diana no expresado en células malignas).

Las dos toxicidades clínicas distintivas asociadas con la terapia con células CAR T son la tormenta de citoquinas (CRS, del inglés *Cytokine Release Syndrome*) y la neurotoxicidad, y ninguna de las dos fue anticipada en los modelos animales antes de su translación a clínica.

En algunos casos, la neurotoxicidad o la insuficiencia multiorgánica asociada al CRS pueden ser letales. Una alta carga tumoral y una mayor expansión de células CAR T se han correlacionado con grados más altos de CRS. En general, los CAR con un dominio de coestimulación 4-1BB parecen causar menos neurotoxicidad y CRS que aquellos con un dominio de coestimulación CD28 (Choi and Lee, 2020).

Síndrome de liberación de citoquinas (CRS). La tormenta de citoquinas se manifiesta típicamente en pacientes dentro de la primera y segunda semana de terapia con células T con CAR frente a CD19, BCMA o CD22 (incluso desde las primeras horas tras la infusión) hasta un mes después y lo hace como fiebre, hipotensión e insuficiencia respiratoria con niveles elevados de citoquinas en suero. Esta reacción es consecuencia directa de la activación de las células CAR-T y de la respuesta de los pacientes a esa activación. La intensidad (siendo los grados 3 y 4 considerados como graves) y cinética de esta tormenta de citoquinas depende de diferentes factores que incluye desde el tipo de neoplasia hematológica (especialmente en LLA, que genera un CRS sistémico), carga tumoral, dosis de CAR-T inoculadas, estado previo del sistema inmunológico, flora intestinal, régimen de linfodepleción e influencia del dominio coestimulador (Schubert *et al.*, 2021). En general, parece que el CRS es más frecuente en CARs-CD28 que en CARs-4-1BB, aunque en ocasiones se han detectado CRS más graves (más de grado 3) con estos últimos (**Tabla 7**).

Las citocinas principalmente implicadas en la patogénesis del CRS incluyen a la interleucina-6 (IL-6), IL-10, IFN- γ , proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Otras citocinas, incluyendo al factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-1, IL-2 e IL-8 también se elevan durante el CRS (Morris *et al.*, 2021).

Síndrome de neurotoxicidad asociado a células efectoras, ICANS (del inglés, *Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome*) es el segundo evento adverso más comúnmente observado relacionado con la terapia de células T-CAR y aparece entre el 60% y el 70% de los pacientes tratados (Santomasso *et al.*, 2018). El ICANS se caracteriza por niveles elevados de

citoquinas en el líquido cefalorraquídeo y alteración de la barrera hematoencefálica y con frecuencia aparece asociado al CRS. Todos los datos apuntan a que la hiperactivación de las células mieloides tiene un papel clave en el desarrollo de ICANS después de la administración de células CAR-T (ver más adelante). Clínicamente, el ICANS se manifiesta como pérdida temporal de la memoria de trabajo, delirio, convulsiones y, en raras ocasiones, edema cerebral agudo y hemorragia. En el caso de la neurotoxicidad mortal debida a edema cerebral, la incidencia es del 3% después del tratamiento de células CAR-T, independientemente de si es con construcciones CD28 o 41BB y en todos los casos, un CRS grave estaba ligado a un ICANS grave (Morris *et al.*, 2021).

Aplasia de células B y citopenias. Otras complicaciones pueden estar causadas por la actividad *on-target* duradera de las células CAR-T. Al estar CD19 presente en las células B normales, puede originarse una hipogammaglobulinemia por una aplasia de células B a largo plazo, que, aunque es tratable y bien tolerado, produce citopenias e hipogammaglobulinemia.

Por otro lado, se han observado citopenias de grado ≥ 3 y neutropenias febriles de grado ≥ 3 en el 31% y el 17% de los pacientes tratados en los ensayos ZUMA-1 (Yescarta) y JULIET (Kymriah). Las citopenias generalmente ocurren dentro de los primeros 30 días después de la infusión de células, pero pueden tardar meses o posiblemente más en resolverse (ocurre en 30% de los pacientes tratados con Kymriah y Yescarta). Es por ello que se están aplicando tratamientos profilácticos antivirales, antibacterianos y antifúngicos durante al menos 1 año de la terapia con CAR-T y con infusiones mensuales de inmunoglobulina G en aquellos pacientes con infecciones virales frecuentes e inoculación del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) en las neutropenias prolongadas (Yáñez, Sánchez-Escamilla and Perales, 2019).

Síndrome de lisis tumoral (TLS, del inglés *Tumor Lysis Syndrome*). Por otro lado, esa alta eficacia a la hora de eliminar las células tumorales, provoca la liberación de una gran cantidad de iones intracelulares y productos metabólicos al torrente sanguíneo que pueden generar un fallo renal agudo y sistémico. Se ha observado en mayor frecuencia en pacientes que no han recibido un régimen de condicionamiento previo.

Anafilaxia e inmunogenicidad. La gran mayoría de los CARs, incluyendo todos los CARs comerciales, contienen una parte no humana (el ScFV, de origen murino) por lo que puede existir un riesgo de reacción alérgica, aunque es poco frecuente (sólo en aquellos casos donde se han re-infundido varias dosis de células CAR-T) sí que se han notificado (Maus *et al.*, 2014). Sin embargo, sí que se han detectado anticuerpos (HAMA, del inglés *Human Anti-Mouse Antibodies*) frente a los antiCD19CAR tras la infusión en los pacientes, aunque no parecieron afectar a la eficacia y persistencia de la terapia. A pesar de ello, algunos grupos están desarrollando

anticuerpos humanizados para sustituir ese ScFv murino y evitar así posibles riesgos de inmunogenicidad (Maude *et al.*, 2016).

Síndrome de activación de macrófagos (MAS). Resulta difícil de distinguir del punto final de la activación masiva provocada por la tormenta de citoquinas, ya que a menudo, los criterios de diagnóstico de CRS de grado ≥ 3 solapan para el diagnóstico de este síndrome y también está causado por una activación y proliferación excesiva de células T y macrófagos. Se trata de una linfocitosis hemofagocítica con niveles muy elevados de ferritina, asociada a un daño renal, pulmonar y/o hepático, muy graves, potencialmente mortales que suele aparecer a los 15-20 días post-infusión (Morris *et al.*, 2021).

Recientemente se ha generado un modelo murino con células CAR-T (frente a CD22) deficientes en perforina, que recapitulan la respuesta hiperinflamatoria bifásica (primero CRS y después MAS), con citoquinas proinflamatorias elevadas (IL-1 β e IL-18 entre otras) tras la eliminación *in vivo* de la leucemia, con esplenomegalia y presencia de hemofagocitos lo que supone un modelo muy interesante desde un punto de vista mecanístico y terapéutico (Morris *et al.*, 2021). Curiosamente, las células CAR-T con deficiencia de perforina aumentaron una cascada proinflamatoria compleja, que incluyó un aumento de los niveles circulantes de IFN γ , una regulación positiva de los miembros de la familia IL-1 y cambios inflamatorios secundarios que recuerdan las firmas de expresión génica informadas en pacientes con HLH y MAS (Ishii *et al.*, 2020).

Genotoxicidad por el vector

Las células CAR- T son generadas por la transducción (modificación genética) con un vector viral (γ -retroviral y lentiviral) que se insertan pseudoaleatoriamente en el genoma de las células ya que los γ -retrovirales sí que tienen preferencia por sitios cercanos al inicio de la transcripción y podría constituir un problema, aunque hasta la fecha, no se ha reportado ningún caso de mutagénesis por inserción en ninguna célula T madura o célula CAR-T.

Por el contrario, los VLs derivan del virus del VIH y no han mostrado preferencia por ningún sitio concreto de la eucromatina, sin observarse transformación ninguna relacionados con lentivirus en más de 190 años de seguimiento acumulativo de pacientes tratados con células T modificadas por ingeniería genética (Marcucci *et al.*, 2018) ni tampoco en pacientes con infectados con VIH por lo que hace que la modificación con VLs sea, a priori, muy segura.

Tabla 7. Porcentajes de efectos secundarios graves de la administración de los siguientes ATMPs.

	Kymriah	Yescarta	Tecartus	Breyanzi	ARI-001
CRS (grado 3 o más)*	LLA: 48% LNH: 23%	LNH: 11% LF: 13%	18%	4%	LLA:13.2% LNH: 25%
ICANs (grado 3 o más)*	LLA:10% LNH: 11%	LNH: 32 % LF: 31%	37%	12%	LLA: 2.6% LNH: 0
Hipo -γ-globulinemia*	LLA: 53% LNH: 44%	16%	16%	32%	LLA: 78.9% LNH: 75%
Infecciones graves* (Grado 3 o más)	LLA: 48% LNH: 34%	19%	30%	19%	21%
Reacciones fatales/muerte	3.48% ⁺	4.31% ⁺	4.8%	1.49 %	LLA: 7.9% LNH: 0

*Datos obtenidos de las fichas técnicas de los ATMPs. ⁺, datos obtenidos de Cai et al., 2020.

7.3.1.1 Fisiopatología de las principales toxicidades de la terapia con CAR-T

Tras el reconocimiento de la diana, las células CAR-T se activan para producir citoquinas, como el interferón- γ (IFN γ), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP), el factor de necrosis tumoral (TNF) y otros factores solubles mediadores de la inflamación (por ejemplo, catecolaminas) que pueden activar macrófagos y tejidos circundantes (**Figura 10**). Además, los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) liberados por las células tumorales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en los macrófagos y pueden amplificar aún más su activación. De una manera dependiente del contacto, el CD40 expresado en macrófagos puede ser acoplado por el ligando CD40 expresado en células CAR T (CD40L) y promover la activación de macrófagos. Estos macrófagos activados secretan mediadores inflamatorios, entre los que se ha demostrado que la IL-6, IL-1 y el óxido nítrico (NO) producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) están directamente implicados en la patología del síndrome de liberación de citocinas (CRS) y contribuyen a su implicación (Morris *et al.*, 2021). Estas citocinas pueden impulsar la patología sistémica del CRS debido a su capacidad para enviar señales a una variedad de tejidos no inmunes como el endotelio, lo que puede resultar en fugas vasculares, hipotensión y una mayor amplificación de la respuesta inflamatoria por la secreción de citocinas y quimiocinas (IL-6, IL-8, antagonista del receptor de IL-1 (IL-1R α), ligando 2 y 3 de quimiocinas (CCL2) y CCL3) y reclutando a monocitos circulantes incrementando así la acumulación de macrófagos activados en el sitio de interacción entre las células CAR T y las células tumorales (Morris *et al.*, 2021).

La difusión de citoquinas y la trans migración de células T con CAR, células T endógenas y monocitos activados periféricamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el sistema nervioso

central (SNC) en la fase 4, incluida la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), coincide con el inicio de ICANS. La neurotoxicidad grave en pacientes se ha correlacionado con niveles elevados de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, ligando 2 de quimiocinas CC (CCL2) y ligando 10 de quimiocinas CXC (CXCL10) en el líquido cefalorraquídeo (Morris *et al.*, 2021).

Dado que el ICANS aparecía con mucha más frecuencia en pacientes tratados con CARs- α CD19, inicialmente se pensó en la posibilidad de que CD19 se expresara en partes del sistema nervioso central. Sin embargo, la existencia de casos de ICANS con células CART dirigidas a CD20, CD22 y BCMA hacía poco probable esta teoría y sugería un mecanismo alternativo (Siegler and Kenderian, 2020). Por otro lado, según los datos de los ensayos clínicos, no se ha encontrado que la infiltración de células CART en el sistema nervioso central se correlacione con ICANS (Santomasso *et al.*, 2018). De hecho, existen evidencias claras de que la hiperactivación de las células mieloides tiene un papel clave en el desarrollo de ICANS después de la administración de células CART. Se ha demostrado que IL-1 e IL-6 (citoquinas derivadas de células mieloides), impulsan la inflamación sistémica que se correlaciona con el desarrollo grave de ICANS (Gust *et al.*, 2017). Por otro lado, GM-CSF fue asociada con el desarrollo de ICANS en el ensayo clínico ZUMA-1 (Neelapu *et al.*, 2017) y el análisis del líquido cefalorraquídeo de pacientes con ICANS grave mostró un aumento significativo en la infiltración de células mieloides. Esta inflamación impulsada por células mieloides puede provocar activación endotelial y disfunción de la barrera hematoencefálica que se observa en pacientes con ICANS.

Clínicamente, el tratamiento principal para superar el CRS es romper el circuito de retroalimentación de las citocinas mediante el tratamiento con un anticuerpo monoclonal frente al receptor de IL-6, Tocilizumab. Los corticosteroides a menudo también se usan en combinación con Tocilizumab para reducir la inflamación y el edema vasogénico en el cerebro (Siegler and Kenderian, 2020). Sin embargo, ninguna de estas intervenciones parece bloquear la expansión de las células CAR T en pacientes.

Se están investigando intervenciones adicionales para controlar la toxicidad más allá del bloqueo del receptor de IL-6, tanto en modelos preclínicos como en ensayos clínicos. La inhibición de la señalización de GM-CSF (Stern *et al.*, 2019), ya sea mediante la neutralización de anticuerpos monoclonales (Lenzilumab) o mediante la alteración genética de las células CAR T para eliminar GM-CSF, puede limitar el CRS y la neuroinflamación. Giavridis *et al.* y Norelli *et al.* han demostrado que la interrupción de la vía de IL-1 con Anakinra, un antagonista del receptor de IL-1, mitiga tanto el CRS como la neurotoxicidad letal en ratones, se está probando clínicamente para prevenir la neurotoxicidad en pacientes tratados con células T CAR (Strati *et al.*, 2020; Larson and Maus, 2021a). Por otro lado, el uso de Etanercept como inhibidor de TNF α también está siendo actualmente evaluado (Siegler and Kenderian, 2020)

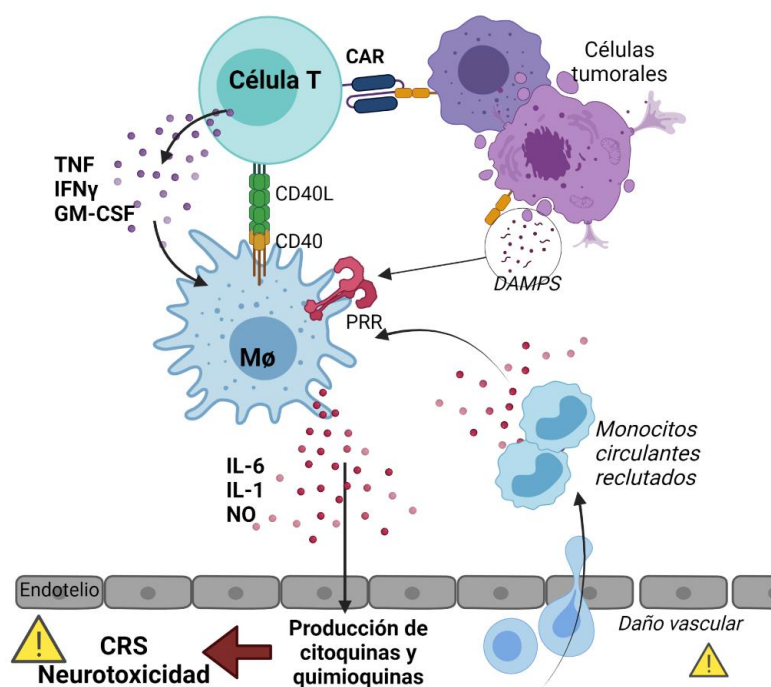


Figura 10. Representación de los procesos que median la CRS y el ICANs tras la administración de las células CAR-T. Tras el reconocimiento del antígeno tumoral, las células CAR-T secretan TNF, IFN γ y GM-CSF principalmente, reclutando y activando a macrófagos, los cuales sufrirán sucesivas rondas de activación a través de citoquinas, señalización de CD40 y por DAMPs presentes en el TME. De este modo, la IL-6, IL-1 y NO que producen, van a su vez, a reclutar a más monocitos circulantes, amplificando así un ciclo de activación masiva. Todo ello, acabará provocando una tormenta de citoquinas y quimioquinas con daño vascular. Si este daño y difusión de citoquinas está presente en el líquido cefalorraquídeo o Sistema nervioso central, favorecerá la neurotoxicidad.

7.3.2 Limitaciones de las terapias CAR-T frente a CD19: falta de eficacia terapéutica, persistencia y escape tumoral

La recaída de la enfermedad después de la terapia con células T con CAR anti-CD19 o anti-CD22 puede ocurrir en hasta el 50% de los pacientes con LLA a los 12 meses después de la infusión en dos patrones principales: recaída temprana manteniendo el antígeno diana o recaída posterior, típicamente asociada con la pérdida de antígeno (**Figura 2**). Una mayor comprensión de los mecanismos que subyacen a la mala persistencia y/o resistencia a las células T con CAR y la identificación de los pacientes con la mayor probabilidad de recaída será crucial para optimizar la terapia con células T con CAR.

Las principales causas de esta falta de eficacia en estos pacientes son:

1. Expansión insuficiente y calidad deficiente del producto de infusión.
2. Falta de persistencia de las células CAR-T *in vivo*.

3. Pérdida de expresión de CD19 por parte de las células tumorales.
4. Capacidad intrínseca de las células tumorales de evadir las respuestas inmunitarias.
5. Y en el caso de los linfomas, existe además otro obstáculo adicional debido a su estructura tumoral que enfrenta a las células CAR-T a un microambiente inmunosupresor y de difícil infiltración.

Barrera 1: Limitación de la terapia asociada a pérdida de la diana

A pesar de las altas tasas de respuesta inicial, las células tumorales han desarrollado diversas estrategias de escape tumoral, con **una pérdida total o parcial de la expresión de la diana**. Por ejemplo, los informes de múltiples ensayos y estudios institucionales han indicado que entre el 7 y el 25% de los pacientes tratados con linfocitos T CAR dirigidos a CD19 recayeron con la enfermedad CD19-, aunque no es el único caso de terapia CAR-T (Majzner and Mackall, 2018). Los mecanismos de pérdida de CD19 incluyen mutaciones y variantes de corte y empalme del gen CD19, así como el cambio de células tumorales de **linaje linfoide (células B) a CD19-mieloide** (Gardner *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020). Aunque las mutaciones puntuales son el mecanismo de resistencia más común, no es el único.

Por otro lado, se ha descrito un segundo mecanismo denominado **trogocitosis** (Hamieh *et al.*, 2019), un proceso activo donde tras el contacto CAR: antígeno, la diana se transfiere a la propia membrana de las células CAR T. Por un lado, no sólo provoca una bajada de la densidad de la diana tumoral, sino que también provoca una muerte cooperativa, un *fratricidio*, donde una célula CAR-T lisa a una célula CAR-T CD19+. Es un proceso que se ha observado en CARs con estructura CD28 y 4-1BB, aunque esa pérdida de densidad antigénica tumoral no afecta tanto a los CAR-CD28, con más potencia.

Barrera 2: Capacidad intrínseca del tumor de evadir al sistema inmunológico y microambiente tumoral

Las terapias frente a leucemias son las que mejores resultados han tenido principalmente por la accesibilidad del tumor. Un linfoma o un tumor sólido, debido a su estructura, suponen una importante barrera, con una menor accesibilidad y un microambiente altamente inmunosupresor. Los mecanismos implicados en esta inmunosupresión incluyen la producción de NO y ROS, la producción de citoquinas como IL-10, IL-1 α , IL-27 o TGF- β , y la presencia de Tregs, Macrófagos asociados a tumores (TAMs) y de células supresoras mieloides (MDSCs). Muchos de estos mecanismos confluyen en los puntos de control inmunitarios tales como el eje PD1/PDL1 o CTLA4/CD80-86 por lo que evitan así que haya una baja infiltración y con baja o nula actividad citotóxica (Larson and Maus, 2021b).

Otro mecanismo de resistencia descrito es **la pérdida y/o deterioro de receptores y elementos de las vías de muerte** en las células tumorales. La pérdida de FADD, BID y ligando 2 inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL2) en las células tumorales las hace más resistentes a la eficacia de las células T CAR dirigidas a CD19, tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a la menor citotoxicidad y proliferación de las células tumorales. Además, la estimulación prolongada del CAR por las células de ALL que carecen de una de estas moléculas receptoras de muerte conduce al agotamiento de las células T (Larson and Maus, 2021a).

Barrera 3: falta de eficacia por una falta de persistencia

La falta de eficacia por tener un producto agotado prematuramente constituye la causa mayoritaria de las recaídas y donde están involucradas diferentes elementos.

Un primer desafío es la generación de un producto autólogo con suficiente calidad para ser re-infundido eficientemente en el paciente. Normalmente, esta terapia es como poco, segunda línea de tratamiento, a menudo tras intensos regímenes de poliquimioterapia lo que no ayuda a unas células T expuestas al tumor durante un largo periodo. El éxito de la terapia se ve influenciado además por el tipo de tumor, por los protocolos de expansión *ex vivo*, tipo de vector utilizado y las características del CAR que se expresa.

Un estudio de respondedores y no respondedores (con resistencia primaria) a las células CAR-T dirigidas a CD19 en pacientes con LLC reveló que las células T en los productos de infusión de los pacientes no respondedores tenían un fenotipo más efector, glucolítico, agotado y apoptótico mientras que los respondedores poseían más células con firma más tipo memoria y mayor expresión del IL-6R y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Kawalekar *et al.*, 2016).

Todo esto va en la dirección de conseguir células más indiferenciadas y menos agotadas desde el proceso de producción (fenotipo más T_{SCM} y T_{CM}), con menor activación independiente de antígeno (señalización tónica y crónica) y menor muerte celular inducida por activación (AICD) como consecuencia de un menor agotamiento.

El **agotamiento** describe la aparición de cambios epigenéticos, a menudo irreversibles, en las células T diferenciadas terminalmente y está asociado a la expresión de diferentes moléculas inhibitoras como PD1, Tim3, LAG-3. Fisiológicamente, el sentido del agotamiento evita una sobreactivación de la célula T cuando son estimuladas repetidamente por el autopéptido/complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y se inactivan. Sin embargo, en la lucha frente a tumor, una exposición continuada al antígeno, hacen que las células T se agoten y sean susceptibles a la AICD, disminuyendo drásticamente su potencial citotóxico.

Aunque se ha demostrado que las células CAR T se someten a AICD a través de la interacción CD95:CD95L, la contracción de las células T puede ocurrir en ausencia de señalización de CD95, CD95L y TNF, lo que sugiere otros mecanismos y no explica por qué algunas células CAR-T no persisten lo suficiente (McLellan and Ali Hosseini Rad, 2019).

Fisiológicamente, la **señalización tónica** continua de bajo nivel a través de interacciones entre el TCR endógeno y las moléculas MHC cargadas con autopéptido constituye un mecanismo importante para regular la homeostasis de las células T (Garbi *et al.*, 2010). La señalización tónica del CAR, sin embargo, puede definirse como una activación no coordinada y sostenida de las células T en una forma dependiente o independiente del ligando. En general, está causada por una alta expresión del CAR en la superficie, en ausencia de control espacial y/o temporal de dicha expresión, por lo que genera una señalización celular constitutiva o crónica. Esto puede tener un efecto deletéreo sustancial en la función efectora y la supervivencia de las células T CAR y con ello, a la capacidad citotóxica (Ajina and Maher, 2018).

La señalización tónica se puede identificar durante la expansión de células T primarias debido a diferencias en el fenotipo y crecimiento de las células CAR-T en comparación con las células T de control por lo que es un parámetro importante a considerar en el diseño del CAR, ya que puede comprometer la calidad del producto CAR manufacturado.

8 ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA EFICACIA Y SEGURIDAD EN LA TERAPIA CON CÉLULAS CAR-T

Los datos de seguimiento de la terapia con células CAR-T frente a CD19 demuestra que solo el 30-50% de los pacientes experimentan un control de la enfermedad a largo plazo, y todavía no han mostrado una actividad clínica reproducible frente a algunos tipos de linfoma (Vitale and Strati, 2020) ni frente a tumores sólidos (Marofi *et al.*, 2021). Por ello, todavía hay mucho margen de mejora y existen múltiples estrategias que se están siguiendo con esta finalidad y que pueden englobarse en 3 categorías:

8.1 INGENIERÍA DE PROTEÍNAS PARA MEJORAR Y CONTROLAR LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA CAR

Este punto ha sido cubierto previamente en los apartados 5.1 y 5.2 de la presente introducción y sintetizado en la **tabla 8**, con el mensaje de que de la arquitectura del CAR debe ser cuidadosamente configurada para cada antígeno con el fin de obtener las mejores condiciones en cuanto eficacia y seguridad. Cada parámetro del ectodominio, su ensamblaje, dominios intracelulares contribuyen a diferentes aspectos críticos en la funcionalidad del CAR y por tanto, de la terapia.

Tabla 8. Potenciales cambios en los diferentes módulos de arquitectura proteica del CAR para modular su actividad y funcionalidad de manera sinérgica.

Componente del CAR	Cambios potenciales	Parámetros que influencia
<i>Ectodominio</i>	Tipo (naturaleza)	Afinidad, Avidéz, Señalización tónica, mecanismos de resistencia por pérdida de antígeno, inmunogenicidad
<i>Dominios linker, Espaciador y TM</i>	Tipo y longitud	Formación de la sinapsis inmunológica, estabilidad del CAR, Producción de citoquinas, AIC, eficacia con tumores de baja densidad antigénica
<i>Co-estimulación</i>	Tipo y número	Expansión inicial
		Persistencia
		Durabilidad de la respuesta
		Señalización: Fenotipo y memoria
		Señalización: Potencial antitumoral
<i>ITAMs</i>	Número de dominios funcionales	Eficacia con tumores de baja densidad antigénica
		Señalización: Agotamiento
		Señalización: potencial antitumoral

8.2 MEJORAS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO, CULTIVO Y MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS T.

Incluso si un producto de células T con CAR se puede fabricar con éxito, se ha demostrado que el fenotipo de células T de partida es un determinante importante de la actividad clínica posterior. La selección de células T con fenotipos específicos, por ejemplo, células T de memoria central (T_{CM}) o de memoria similar a células troncales (T_{SCM}), antes de la fabricación o la manipulación de las condiciones de fabricación para sesgar la producción de células T CAR hacia una población de células T en particular, podría mejorar la probabilidad de generar un producto exitoso (Sabatino *et al.*, 2016).

Respecto al ratio CD4/CD8, casi todos los productos de células CAR-T se generan utilizando tanto células CD4+ como CD8+ y ambas poblaciones de células probablemente contribuyan a la eficacia terapéutica. La proporción de células T CD4/CD8 puede variar sustancialmente entre pacientes y también podría afectar el producto de células CAR-T. Por ejemplo, Breyanzi es un producto de células CAR-T CD4+ y CD8+ manufacturados por separado para su administración a los pacientes en una proporción definida 1:1. El hecho de seleccionar las células CD4 y CD8 puede mejorar también la presencia de células contaminantes inmunosupresoras derivadas de mieloides que pueden inhibir el crecimiento de las células T y blastos circulantes (Shah and Fry, 2019).

Por otro lado, la modificación genética llevada a cabo por vectores lentivirales vs γ -retrovirales mejora la señalización tónica y con ello, la calidad del producto de partida (Gomes-Silva *et al.*, 2017; Ajina and Maher, 2018). Además, el uso de agentes farmacológicos para inhibir o remodelar las consecuencias negativas de la señalización tónica CAR, como el agotamiento y la diferenciación terminal, por ejemplo, con inhibidores de glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β), lo que favorece la activación de la ruta de Wnt/ β -Catenina y un fenotipo más T_{SCM} (Sabatino *et al.*, 2016). En otro caso, el uso combinado de la terapia CAR-T con Idelalisib, el cual hemos visto previamente como tratamiento tumoral frente a LLC, generó mayor persistencia en la terapia CAR-T y una potente regresión tumoral a largo plazo, lo que demuestra un efecto sinérgico (Bowers *et al.*, 2017).

8.3 MEJORAS EN LOS SISTEMAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA CON LA FINALIDAD DE CONTROLAR LOS NIVELES DEL CAR Y OTROS GENES.

En este apartado, nos centraremos en describir la **importancia de los sistemas de modificación genética para conseguir mejorar la eficacia y seguridad de las células CAR-T**. Particularmente, en la necesidad de disponer de sistemas que permitan controlar la expresión de

los GOIs (incluyendo el CAR) de una forma precisa y que responda a las necesidades de cada estrategia.

Estrategias para mejorar los CAR-T a través del control de la expresión

Como se ha descrito con anterioridad, es obvio que si queremos mejorar las terapias con células T-CAR, es fundamental mejorar los CARs, así como los procedimientos y herramientas para su generación. De hecho, es en estos dos campos donde la mayor parte de los grupos ha centrado su atención para mejorar las terapias CAR-T. Sin embargo, parece también obvio que es importante conseguir que cada **CAR se exprese a un nivel adecuado** en la superficie de la célula T. Sobre todo, si tenemos en cuenta que cada CAR tiene una afinidad de unión a su antígeno diferente, el cual puede presentarse con una densidad distinta en la membrana de la célula tumoral. Esto es aún más relevante si consideramos la capacidad de auto-agregación (*clustering*) de cada CAR, pudiendo dar lugar a fuertes señalizaciones tónicas en ausencia de antígeno, con el consiguiente agotamiento y potenciales efectos secundarios. Para evitar o disminuir estos problemas, sería necesario estudiar en detalle qué niveles y/o patrón de expresión es idóneo para cada CAR.

Por supuesto, un mejor patrón de expresión del CAR no es lo único que puede aportar los sistemas de control de la expresión de la *caja de herramientas* de la terapia génica. Por ejemplo, los denominados sistemas inducibles pueden conseguir que un determinado GOI se exprese exclusivamente en determinadas condiciones fisiológicas (regulación endógena) o que lo haga sólo cuando el clínico lo desee (regulación exógena, Tristán-Manzano *et al.*, 2020a).

Ambos sistemas están siendo estudiados con la finalidad de mejorar la potencia de las células CAR-T. Por ejemplo, la regulación endógena (Brandt *et al.*, 2020) se ha utilizado para lograr la expresión de citoquinas como la IL-12 específicamente en las zonas tumorales, principalmente cuando las células CAR-T (TRUCKs) se encuentran con su antígeno diana (Chmielewski *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de su elevado potencial, estos sistemas no pueden ser controlados de forma externa, pudiendo dar lugar a efectos indeseados en caso de inducirse en tejidos normales.

Por ello se están desarrollando diferentes sistemas que permitan controlar cualquier GOI de forma externa, mediante la administración de una droga inocua (Sakemura *et al.*, 2016; Drent *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, por el momento no hay ningún sistema que cumpla con todos los requisitos de eficacia y seguridad como para ser utilizado en clínica.

Dado que en esta Tesis nuestro foco pretende lograr una expresión del CAR óptima y en desarrollar sistemas de control exógeno, nos centraremos en describir a continuación, el estado del arte en estas dos áreas:

8.3.1 Control de la expresión del CAR: niveles y cinética de expresión

Como se mencionaba anteriormente, parece evidente que es importante conseguir que cada CAR se exprese a los niveles adecuados en la superficie de la célula T. Estos niveles variarán en función de la afinidad del CAR para unirse a su antígeno. Además de la afinidad, otro parámetro determinante del comportamiento de la célula CAR-T es la avidéz, y ésta depende tanto de los niveles de expresión del antígeno tumoral como la expresión en superficie. Así se han descrito casos donde una baja expresión parece haberse asociado a una eficacia tumoral limitada frente a ciertos antígenos como CD123 (Arcangeli *et al.*, 2017) y frente al antígeno ALK (Walker *et al.*, 2017).

Sin embargo, otros estudios muestran que promotores de baja expresión, como el MND, generan un mejor potencial antitumoral *in vivo*. Así, en un ensayo clínico reciente donde se utilizó este promotor para expresar un antiCD19CAR (ClinicalTrials.gov: NCT03840317) se obtuvieron los mismos ratios de respuesta que cuando el mismo CAR se expresó con el promotor EF1 α , pero con menos secreción de IFN γ y fiebre (Ho *et al.*, 2021).

Por el contrario, se ha demostrado niveles altos y la expresión continua del CAR pueden ser perjudiciales para la eficacia y seguridad de los productos CAR-T (Frigault *et al.*, 2015; Eyquem *et al.*, 2017; Gomes-Silva *et al.*, 2017). Una alta densidad del CAR puede también resultar en agregados de CAR en la superficie lo que deriva en una señalización tónica independiente de antígeno (Ajina and Maher 2018), y esto conlleva a una activación crónica, incremento de la diferenciación de la célula T, agotamiento y AICD, y con ello, a una menor eficacia y persistencia antitumoral *in vivo*. Además, esta señalización tónica puede afectar la seguridad (secreción de citocinas proinflamatorias en tejidos no diana) junto con a una mayor sobreestimulación tras el reconocimiento de la diana tumoral secretando un exceso de citocinas proinflamatorias (CRS).

Una de las causas de esta alta densidad viene por utilizar un promotor constitutivo fuerte de manera no regulada (Frigault *et al.*, 2015; Eyquem *et al.*, 2017; Ajina and Maher 2018). De hecho, todos los ATMP aprobados y la mayoría de los que se han probado en ensayos clínicos en curso utilizan células T autólogas transducidas con vectores retrovirales que expresan un α CD19-CAR, u otros CARs, a través de promotores fuertes y constitutivos como el EF1 α humano o el LTR del virus MSCV.

Sin embargo, al hablar de los niveles del CAR en superficie, hay que tener en cuenta que éstos pueden variar a lo largo del proceso de activación de la célula T-CAR. De hecho, esto parece ser un factor importante a considerar, al menos para algunos tipos de CARs. Eyquem y colaboradores (2017) demostraron que cuando el CAR se regula de una manera similar al TCR, es decir, con una reducción de los niveles en superficie tras el encuentro con el antígeno, se produce menor señalización tónica, una reducción del agotamiento de CAR-T y una mayor proporción de células T_{SCM} CAR-T, lo que resultó en una mejor actividad antitumoral. Este fenómeno de regular a la baja el CAR para evitar un agotamiento prematuro también ha sido corroborado por Weber y colaboradores (2021) en una estrategia diferente, donde el reposo se inducía con el inhibidor reversible de las tirosinas quinasas de la célula CAR-T (Dasatinib) y por un sistema ON/OFF que permitía la expresión del CAR tras la adición de otro fármaco. Así, queda de manifiesto que un “descanso” en la actividad del CAR le va a permitir volver al *frente tumoral* en mejores condiciones.

8.3.2 Sistemas inducibles para regular la actividad de las células CAR-T

Una de las estrategias para incrementar la potencia de la terapia CAR frente a linfomas y tumores sólidos, incluye la secreción y/o expresión continua de moléculas muy activas (como IL-12, interferones (IFN) y que, debido su potencia, pueden generar eventos clínicos adversos que pueden conducir a daños en los órganos potencialmente mortales, así como una *hiperprogresión* tumoral (Chmielewski and Abken, 2020; He and Xu, 2020). Esta toxicidad también limita la eficacia, debido a la imposibilidad de alcanzar las concentraciones adecuadas en los órganos diana. Por tanto, existe una clara necesidad de desarrollar estrategias que permitan entregar estas moléculas dentro de los tejidos diana y hacerlo solo cuando sea necesario (o cuando el clínico estime oportuno).

El desarrollo de sistemas que permitan generar células T que expresen citoquinas, anticuerpos u otros GOIs sólo cuando el paciente tome un fármaco inductor inocuo, podría incrementar drásticamente la potencia de las estrategias de inmunoterapia basadas en células T, incluyendo las células CAR-T y los TILs, sin que resulten en efectos tóxicos intolerables.

En este sentido, el campo de la terapia génica ha desarrollado múltiples estrategias para controlar la potencia y duración de las respuestas inmunitarias mediante el control de la expresión génica, siendo muy interesantes para su aplicación en la nueva generación de TRUCKs inducibles.

Los sistemas de control remoto permiten la modulación de la actividad y los efectos secundarios asociados. Esos enfoques se basan en la coadministración de un inductor, que debe cumplir ciertas características en términos de farmacocinética, tolerabilidad y biodistribución.

A continuación, nos centraremos en describir aquellos sistemas inducibles exógenamente, que sean versátiles (que permitan ingenierizarse para controlar la expresión de proteínas de diferentes tamaños o funcionalidades como citoquinas, metaloproteasas, entre otras), puedan aplicarse a clínica con seguridad y sean reversibles.

Existen otros sistemas inducibles que son específicos de la proteína CAR, como SUPRA-CARs, los basados en el sistema SynNotch o bien los inducibles por Rapamicina y análogos, cuyo control de la actividad es a nivel de interacciones proteína-proteína. También descartaremos en este apartado aquellos sistemas irreversibles basados en las iCasp, (caspasa inducible) (Brandt *et al.*, 2020).

Así, para comparar los diferentes sistemas versátiles disponibles para aplicaciones clínicas, consideraremos varias características, incluidas las propiedades del inductor, la arquitectura del vector, sistemas entregados en uno o dos plásmidos, los diferentes promotores, el tipo células diana, y la presencia fuga o *leaking* (expresión basal en ausencia del inductor) y otros riesgos potenciales.

Para mayor claridad, se pueden clasificar en dos grupos principales: (1) los basados en la administración de fármacos y (2) los basados en la aplicación de inductores físicos (luz, ultrasonidos o irradiación).

8.3.2.1 Base de los sistemas inducibles por un fármaco

Los sistemas inducibles controlados mediante la administración de fármacos están diseñados para desencadenar cambios conformacionales en las proteínas diana para que induzcan (sistemas ON) o bloqueen (sistemas OFF) la transcripción de los transgenes deseados. Los sistemas OFF tienen la desventaja de la administración continua del inductor, necesario para silenciar la expresión del transgén. Los niveles altos permanentes de antibióticos, por ejemplo, pueden provocar varias complicaciones para los pacientes y, el riesgo de generar resistencias, por lo tanto, tienen aplicaciones muy limitadas en clínica.

Así, nos centraremos en los sistemas ON. Estos sistemas requieren, en general, dos componentes clave:

1. un factor de transcripción quimérico que contiene un dominio de unión a ADN y un dominio de unión a fármaco.
2. un promotor mínimo regulado, con muy baja actividad basal, seguido del gen de interés. Este promotor incluye varias copias de un sitio de unión al ADN no natural en el que el factor de transcripción quimérico se une en presencia del fármaco.

Con estas características podemos encontrar sistemas utilizados en inmunoterapia que se inducen por tetraciclinas, mifepristona, ecdisoma, y derivados de todos ellos (Tristán-Manzano *et al.*, 2020a). En general, son fármacos aprobados por la FDA (o designados en *fast-track*) de carácter pequeño y polar por lo que pueden cruzar la barrera hematoencefálica, con una vida media variable que oscila entre 5h y 60h dependiendo del compuesto (Tristán-Manzano *et al.*, 2020a). A continuación, se describen brevemente los sistemas más relevantes centrados en regular la expresión de cualquier GOI.

8.3.2.2 *Sistemas inducibles por tetraciclinas*

Los sistemas de control de la expresión génica basados en tetraciclina (Tet) se han establecido como los sistemas por excelencia para la inducción de genes debido a su facilidad de manejo, alta eficiencia y efectos secundarios mínimos. Este sistema, ha sido diseñado para tener tres configuraciones diferentes (Tet-On, Tet-Off-tTA y Tet-On-rtTA) siendo también sensibles a su análogo Doxiciclina (Dox).

Todos ellos se basan en el operón de resistencia a tetraciclina Tn10 de *Escherichia coli*, el cual consiste en una proteína represora de tetraciclina (TetR) y un sitio específico de unión al ADN, la secuencia operadora TetO. En su diseño natural y en ausencia de tetraciclina, el TetR dimeriza y se une al TetO, previniendo la expresión a través de un promotor funcional como el del citomegalovirus (CMV) (**Figura 11**). La tetraciclina o algún derivado de ésta, como la Dox, pueden unirse al TetR provocando un cambio conformacional, disociándose del TetO y permitiendo ahora la expresión a través del promotor que estaba siendo bloqueado (sistema Tet-ON original, **Figura 11** arriba).

Sin embargo, la mayoría de los sistemas regulados por tetraciclina utilizan un transactivador, una proteína quimérica que generalmente incluye el dominio activador de la proteína VP16 del virus herpes simple fusionada al represor TetR (tTA para el sistema Tet-OFF y rtTA para el sistema Tet-ON). En el sistema Tet-ON basado en rtTA, la proteína TetR ha sido modificada para que sólo sea capaz de unirse al operón TetO en presencia de Dox (al contrario que la proteína TetR original). Por lo tanto, sin Dox, el rtTA no se une al promotor mínimo y no se produce la transcripción (**Figura 11**, abajo izquierda). La presencia de doxiciclina hace que el rtTA pueda unirse al promotor mínimo (sin actividad transcripcional) y permitiendo así la transcripción gracias al dominio VP16.

La presencia de este dominio transactivador puede generar una serie de consecuencias indeseadas debido al secuestro de factores de transcripción requeridos para el crecimiento celular (Morimoto and Kopan, 2009). Además, la unión de la proteína TetR-VP16 quimérica a sitios pseudo-TetO presentes en el genoma, pudiendo *transactivar* genes no específicos con efectos

secundarios impredecibles (Hackl *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012). Por tanto, aunque los sistemas rtTA/tetO o tTA/TetO son útiles para una expresión del transgén condicionada, tienen la desventaja de alterar o influir en la fisiología celular por lo que no son óptimos para su aplicación en clínica.

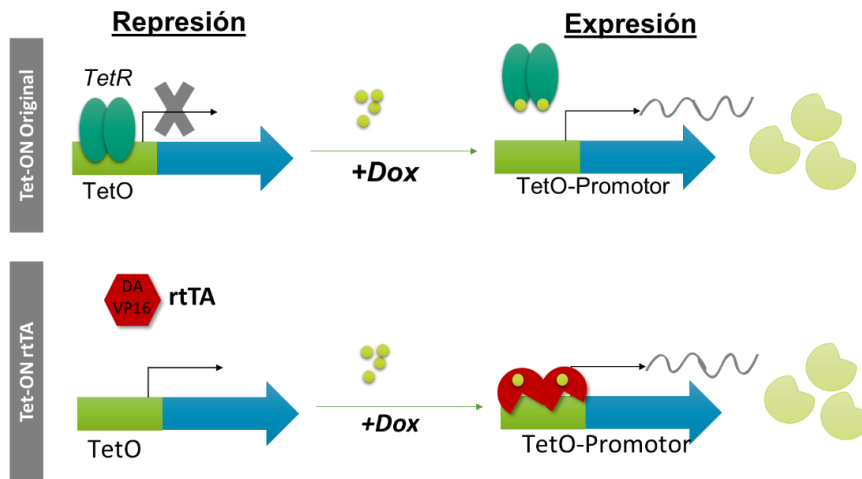


Figura 11. Representación esquemática del funcionamiento del sistema TetOn en presencia y ausencia de transactivador. Arriba: Tet-On original. Abajo: Tet-On-rtTA. DA indica Dominio Activador del VP-16.

En esta dirección, nuestro grupo ha desarrollado sistemas inducibles basados en los sistemas TetR originales todo en uno, “*all-in-one*” que han logrado controlar la expresión transgénica en ausencia de transactivadores en la mayoría de los tipos celulares analizados incluyendo células troncales.

Podemos distinguir los sistemas CEST (Benabdellah *et al.*, 2011) y Lent-On-Plus (Benabdellah *et al.*, 2016). Ambos sistemas contienen en el mismo esqueleto lentiviral todos los elementos requeridos para regular la expresión del transgén: la secuencia que codifica para el TetR original bajo un promotor constitutivo (SFFV, en el caso de los vectores CEST, o EF1- α , para los vectores Lent-On-Plus) y un promotor de respuesta a tetraciclina (TRE). En la configuración de ambos sistemas, el promotor TRE consiste en la fusión de un promotor que se expresa en mamíferos (CMV) con dos repeticiones del operón TetO, posicionadas 10 pares de bases aguas abajo al elemento TATA de dicho promotor.

De esta manera, en ausencia de Dox, el elemento TetR se une al operón TetO, inhibiendo la transcripción del promotor CMV. Mientras que en presencia de Dox, ésta se une al TetR permitiendo así la transcripción del gen de interés. Por tanto, podemos decir que uno de los aspectos más interesantes de estos sistemas es que se basan en el represor TetR original, sin transactivadores, lo cual los hace aptos para su uso clínico. Además, dos de estos vectores

(CESTIs2 y CEETIs2) contienen una secuencia aisladora, en concreto, el aislador quimérico Is2 (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018), basado en la región HS4 del locus de la beta-globulina de pollo y en una región de unión a una matriz sintética (SAR2) el cual ha sido capaz de aumentar la expresión y evitar el silenciamiento de VLs en células madre embrionarias humanas (hESCs) durante la expansión y tras la diferenciación hacia el linaje hematopoyético.

A continuación, describiremos las estrategias inducibles por Dox basadas en los sistemas Tet-ON en presencia de transactivadores que se han utilizado en inmunoterapia, exclusivamente para regular la expresión del CAR (revisadas en Tristán-Manzano *et al.*, 2020b).

El grupo de Sakemura y colaboradores (2016) fueron los primeros en utilizar el vector Tet-ON-rtTA *todo en uno*-pRetroX-TetOne-3G de Takara (todo en un único vector) para regular la expresión de CAR de segunda generación CD19CAR-tEGFR en células T primarias CD8+. Tuvieron que realizar un paso de selección para obtener una población pura CAR+. Utilizando 100 ng/ml de Dox para la inducción, mostraron un incremento de la expresión, aunque presentaba un *leaking* (expresión en ausencia del inductor) total en ausencia de Dox *in vitro*. Sin embargo, a pesar del alto *leaking*, sólo las células Tet-CD19CAR-T incubadas con Dox antes de la inoculación suprimieron el crecimiento tumoral *in vivo* (Sakemura *et al.*, 2016).

El grupo de Gu *et al.* generaron un vector todo-en-uno que expresa la proteína rtTA2S-M2 (una versión mejorada de rtTA) y CD19-CAR. En este caso, fue necesaria una concentración de 4 µg/ml de Dox para inducir 5 veces la expresión de CAR. A pesar de que se encontraron claras diferencias de eficacia antitumoral *in vitro* entre las células (Dox +) Tet-CD19 CAR-T y las células (Dox-) Tet-CD19 CAR-T, el sistema exhibe una expresión de CAR significativa en ausencia de Dox. En este caso, a pesar de que las células CAR-T pre-inducidas con Dox mostraron citotoxicidad *in vivo*, también se observó cierta lisis en ausencia de la Dox (Gu *et al.*, 2018).

La eficacia del sistema TetOn también se ha probado en estrategias frente el mieloma múltiple (MM), utilizando el antígeno CD38 como objetivo de las células CAR T reguladas por Dox. Aquí, los autores utilizaron dos vectores, el vector pRetroX-TRE3G para controlar la expresión del CD38-CAR y el pRetroX-TET-On 3G para la expresión del transactivador rtTA. y seleccionaron mediante puromicina a las células que había incluido ambos vectores para obtener una población pura. La lisis máxima se evaluó *in vitro* con 1.000 ng/ml de Dox y se demostró además una rápida reversión de la actividad CAR tras una exposición corta (de 24 h) con 10 ng/ml de Dox (Drent *et al.*, 2018).

También existen ensayos preclínicos que utilizan el sistema Tet-On 3G en tumores sólidos, específicamente para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (CCH). Zhang y sus colaboradores construyeron el vector lentiviral Tet-CD147-CAR para generar células Tet-CD147-CART. Con una concentración de 1000 ng/ml Dox, la expresión de CAR alcanzó el pico

a las 24 h y volvió al nivel inicial a las 48 h después de la eliminación de Dox, pero la expresión nunca llegó a cero. Las células CART exhibieron una mayor actividad lítica en presencia de Dox, pero se observó una lisis residual como consecuencia del *leaking* en la expresión del CAR. En un modelo de ratón con CCH, los ratones tratados con (Dox+) Tet-CD147-CART antes de la inoculación, redujeron significativamente el volumen y el peso del tumor en comparación con los ratones que recibieron (Dox-) Tet-CD147-CART (26), pero con un cierto efecto lítico en ausencia de Dox (Zhang *et al.*, 2019).

Tabla 9 Características de los estudios CAR-inducibles por Dox.

Sistema	Diana	Vector	Población	Dosis	<i>In vivo</i>	Leaking	rTA?	Ref
Tet-on 3G (TaKaRa Bio)	CD19	Uno	Selección	100ng/ml	Sí, pre-inducida	Sí	Sí	Sakemura et al, 2016
Tet-on (Sangon Biotech)	CD19	Dual	Mixta	4g/ml	No	Sí	Sí	Gu et al, 2018
Tet-on 3G (Clontech)	CD38	Dual	Selección	1000 ng/ul	No	No	Sí	Drent et al, 2018
Tet-on 3G (TaKaRa Bio)	CD147	Uno	Mixta	1000 ng/ml	Sí, pre-inducida	Sí	Sí	Zhang et al, 2019

8.3.2.3 Sistemas regulados por ecdisterona y mifepristona

Otros sistemas interesantes para el control de la expresión génica a través de fármacos de una manera rápida, precisa, robusta y reversión están basados en el uso de esteroides, los cuales además pueden ser metabolizados rápidamente y penetrar en todos los tejidos (Tristán-Manzano *et al.*, 2020a). Destacamos los sistemas inducidos por ecdisterona y mifepristona.

El primero está basado en el receptor de **ecdisterona** de *Drosophila melanogaster* para regular los transgenes, y ha servido de punto de partida para el sistema RheoSwitch Therapeutic System (RTS), el cual ha sido validado clínicamente para el control de la expresión de IL-12 a través de ensayos clínicos a través de diferentes estrategias (Barrett *et al.*, 2018).

Este sistema RTS requiere de dos factores de transcripción (VP16-RXR y Gal4-EcR), un promotor inducible y el ligando, el cual provoca la dimerización de ambos factores, pudiendo así unirse a la secuencia promotora a través del dominio Gal-4 y VP16 que actúa como transactivador, para iniciar la transcripción (Barrett *et al.*, 2018).

Respecto al ligando, los ecdisteroides están presentes en las verduras, por lo que su seguridad para los seres humanos está ampliamente probada. Velelimex es un análogo sintético de la ecdisterona utilizado en el sistema RheoSwitch y actualmente se encuentra bajo

investigación en la línea *Fast-track* de la FDA debido a sus características farmacocinéticas y sus potenciales beneficios como inductor en ensayos clínicos tras la aplicación intratumoral de un vector adenoviral Ad-RTShII-12 inducible para IL-12 en pacientes con glioblastoma recurrente o progresivo (solo o combinado con anti- PDL1), melanoma y cáncer de mama avanzado. Aunque algunos pacientes presentaron efectos secundarios graves, fueron rápidamente revertidos tras dejar de tomar veledimex (Barrett *et al.*, 2018).

En el caso de los **sistemas inducibles por mifepristona** (MFP), la regulación también requiere de un transactivador, aunque en este caso, el dominio activador de VP-16 ha sido sustituido por p65, uno de los componentes del factor de transcripción de NF- κ B, y se conoce comercialmente como GeneSwitch (Nordstrom, 2003). Funciona con los mismos principios de Gal4 de unión al promotor descritos para el sistema de ecdisterona.

El inductor, MFP, es un fármaco aprobado por la FDA como anti-progestágeno y anti-glucocorticoide, mostrando perfil un aparentemente seguro. Sin embargo, podría constituir un problema cuando se traslade a células T, las cuales poseen receptores de progesterona en membrana y se ha demostrado que 5mM pueden inhibir la proliferación de las células Jurkat (Chien *et al.*, 2009).

El comportamiento de este sistema ha sido evaluado en una estrategia para lograr la expresión hepática específica de IL-12 en un vector adenoviral que alberga las secuencias para la unión de GAL4 en un promotor específico del hígado que impulsa la expresión de IL-12. La administración directa de estos Adv permitió controlar la expresión de hIL-12 además de la regresión tumoral completa en un modelo agresivo de metástasis hepáticas *in vivo* (Liefhebber *et al.*, 2019).

En un enfoque diferente, se utilizó MFP-GS para expresar IFN β para el tratamiento de un modelo murino de esclerosis múltiple, enfermedad autoinflamatoria experimental (EAE). En este modelo, una sola administración intramuscular del vector mIFN β inducible suministrado como plásmido de ADN fue suficiente para disminuir significativamente la aparición de la enfermedad. El procedimiento fue bien tolerado y la gravedad general fue reducida (Harkins *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Actualmente, la inmunoterapia utilizando células CAR-T se ha convertido en una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer, especialmente para leucemias linfoides de tipo B refractarios y/o recidivantes. Prueba de ello, es que a día de hoy, cinco productos CAR-T han sido aprobados desde 2017 como medicamentos de terapias avanzadas tanto por la FDA como por la EMA: tisagenlecleucel (Kymriah, Novartis), axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Kite-Gilead), brexucabtagene autoleucel (Tecartus, Kite-Gilead) y lisocabtagene maraleucel (Breyanzi, Bristol Myers Squibb) para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y frente linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) en recaída o refractarios, mientras que idecabtagene vicleucel (Abecma, Bristol Myers Squibb) ha sido aprobado frente al antígeno BCMA en mieloma múltiple refractario. En España también ha sido recientemente aprobado por la Agencia Española del Medicamento (AEMPS), un producto CAR académico de origen español frente a tumores CD19+, ARI-0001 para el tratamiento de LLA.

Las células CAR-T comerciales son células T autólogas modificadas genéticamente *ex vivo* para que expresen establemente el CAR. Dicha modificación genética se realiza a través de vectores retrovirales (γ -retrovirales o lentivirales) con la finalidad de que el CAR se exprese en las células T de forma estable en las células modificadas y en todas las células hijas. Los vectores lentivirales (VLs) derivados del virus del VIH-1 son herramientas aprobadas por la FDA y EMA en el proceso de manufactura de ATMPs (Kymriah, Breyanzi and Zynteglo), siendo seguros y muy resistentes al silenciamiento.

Por otro lado, a pesar de los buenos resultados obtenidos frente a tumores CD19+, todavía existen varios aspectos que deben mejorarse. Existen algunos efectos secundarios severos debido a la activación de las células CAR-T, como son el síndrome de liberación de citoquinas grave y la neuroinflamación que ha llevado en algunos casos a un desenlace fatal.

Respecto a la eficacia, sólo el 40-62% de los pacientes tratados con los ATMPs comerciales han mantenido una remisión completa sostenida dependiendo del producto.

Existen diferentes trabajos que han destacado la importancia de controlar la expresión del CAR en superficie de manera adecuada para ser más eficiente y seguro: una baja expresión generaría una ausencia de actividad (anergia), un exceso de activación conllevaría un fenómeno de agotamiento prematuro y señalización tónica, haciéndolo ineficiente y probablemente tóxico, mientras que un “reposo transiente” de la expresión del CAR en la superficie puede ser beneficioso (Weber et al 2021). En esa dirección, Sadelain y colaboradores (2017) ha demostrado mediante herramientas de edición genómica que cuando la expresión del CAR se regula a través del promotor endógeno del receptor de la célula T (TCR), existe una menor señalización tónica,

menor agotamiento, aumentando así la eficacia antitumoral. Considerando lo anterior, se hace evidente la necesidad de controlar los niveles de expresión de los CARs en las células CAR-T para optimizar este producto.

Por otro lado, un control preciso, versátil y exógeno de la expresión de proteínas altamente bioactivas supondría un avance en la generación de células TRUCKs inducibles. Los TRUCKs actuales, además de expresar el CAR de manera constitutiva, secretan citoquinas como IL-12 bien bajo promotores constitutivos o bajo promotores sensibles al estado de activación de la célula T. El hecho de poder controlar la expresión de este tipo de moléculas en el tiempo y espacio, con un fármaco de carácter inocuo, permitiría un mejor control de la actividad de la célula TRUCK, incrementando así la potencia (mejor agotamiento) y la seguridad de la terapia como estrategia frente a ciertos tipos de linfoma y tumores sólidos, los cuales siguen sin abordarse eficazmente.

Nuestra hipótesis es que una expresión controlada del CAR y/o de otras moléculas relevantes en inmunoterapia van a permitir controlar y mejorar la actividad de las células CAR-T evitando así una sobre-activación y un agotamiento prematuro de éstas.

En esta tesis doctoral, nos planteamos la optimización y desarrollo de nuevas estrategias orientadas a la mejora de la seguridad y eficacia de las células CAR-T a través de dos abordajes. Uno, mediante el control de la expresión del CAR de manera endógena mimetizando una regulación fisiológica; y en segundo lugar, con un sistema inducible que permita el control exógeno de la expresión de proteínas de relevancia terapéutica en las células T.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en desarrollar una nueva estrategia terapéutica más segura y eficiente mediante el control de la expresión del CAR a través de dos estrategias: 1) utilizando un promotor “fisiológico” que mimetice el patrón del receptor de la célula T (TCR) y/o 2) a través de sistema inducible por doxiciclina utilizando un sistema apto para clínica que permita una regulación más precisa y que pueda reducir los efectos secundarios y/o mejorar la eficacia terapéutica utilizando vectores lentivirales.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de las herramientas necesarias para la generación de células CAR-T.

- a. Aislamiento y expansión de células T primarias de donante sano.
- b. Optimización de la transducción de células T primarias con VLs para una modificación genética estable.

2. Desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* para determinar la lisis tumoral y eficiencia terapéutica.

- a. Generación de un vector que permita la monitorización *in vitro* e *in vivo* del desarrollo tumoral: vector eGFP-NanoLuc.
- b. Transducción y generación de líneas celulares estables.
- c. Generación de modelos animales.

3. Generación de células α CD19-CAR-T con una expresión fisiológica.

- a. Estudio del comportamiento de diferentes promotores que permitan una expresión regulada de un gen reportero GFP mimetizando el patrón del receptor de la célula T (TCR) tras estimulación antigénica.
- b. Generación de VLs α CD19-CAR-T con los mejores promotores del punto anterior que permitan la modificación eficiente de las células T.
- c. Estudio de la eficacia y seguridad de las diferentes células α CD19-CAR-T fisiológicas.

4. Ensayos preclínicos de funcionalidad *in vivo* de las nuevas células CAR-T fisiológicas y su escalabilidad en la producción clínica.

- a. Estudios comparativos *in vivo*.

- b. Escalabilidad en la producción de las células CAR-T fisiológicas en un biorreactor CliniMACs Prodigy.

5. Generación de células T inducibles basados en el sistema TetOn libre de transactivadores como herramienta de inmunoterapia.

- a. Producción de VLS-eGFP inducibles por doxiciclina.
- b. Evaluación del mejor VL basado en el sistema Tet-On para células T usando un gen reportero.
- c. Estudio de la inclusión de elementos aisladores en el mejor VL seleccionado en el punto anterior.
- d. Generación de VLS-T-CARS-CD19 inducibles por doxiciclina como prueba de concepto.
- e. Determinación de la eficacia de expresión, inducibilidad y reversión *in vitro* e *in vivo*.
- f. Ensayos preclínicos de funcionalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

1.1 Líneas celulares en suspensión

Las líneas celulares humanas **Nalm6** (CD19+, derivada de leucemia linfoblástica aguda, ATCC® CRL-3273), **Namalwa** (CD19+, linfoma de Burkitt, ATCC® CRL-1432), **Jurkat** (CD3+, leucemia crónica de células T, ATCC® TIB-152), **HL-60** (leucemia promielocítica, ATCC® CCL-240) y **K562** (leucemia mieloide crónica, ATCC® CCL-243™), se cultivaron en medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowest) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S, Biowest) en una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂. Se mantuvieron a una densidad entre 0.1-1 x10⁶ células/ml y se realizaron tres pases semanales. Todas las células fueron testadas para micoplasma rutinariamente.

1.2 Líneas celulares adherentes

Las células **HEK-293T** (ATCC® CRL-11268) utilizadas para la producción viral se cultivaron en DMEM (*Biowest*) DMEN suplementado con 10% FBS, a 37°C y 10% de CO₂. Se realizaron tres pases semanales cuando la confluencia era un 90% utilizando TryPLE (Gibco) 0.4% tras un lavado previo con PBS.

Las líneas **MiaPaCa2** (carcinoma de páncreas, ATCC® CRL-1420™) y **BXPC3** (adenocarcinoma pancreático ATCC® CRL-1687™) fueron cultivadas en DMEM y RPMI, respectivamente, suplementados con 10% FBS y 1% PS a 37°C y 5% de CO₂. Se realizaron subcultivos de 1:10-1:20 para las células MiaPaCa2 y 1:5- 1:10 para las células BxPC3. Todas las células fueron testadas para micoplasma rutinariamente.

1.3 Aislamiento de células mononucleares procedentes de sangre periférica o movilizada

Se aislaron células T primarias de productos de aféresis frescos o congelados obtenidos de donantes sanos en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Todos los donantes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio se realizó de acuerdo con las directrices del comité de ética, cumpliendo con los requisitos de calidad y seguridad para la donación, obtención, almacenamiento, distribución y preservación de células y tejidos humanos bajo la normativa española. Reglamento (RD-L 9/2014). La sangre fue diluida de 1:2 hasta 1:4 en PBS dependiendo de la densidad celular y se procedió a la separación por Ficoll (Lymphosep, Biowest), utilizando 1/3 de Ficoll y 2/3 de la sangre diluida, mediante centrifugación sin freno ni aceleración a 200g 30 min. Posteriormente, se recogió la fracción de

células mononucleares (PMBCs) con una pipeta *pasteur* y fueron lavadas a 200g 10 min dos veces para eliminar plaquetas.

1.4 Aislamiento, cultivo y activación de células T primarias

Las células T se aislaron a partir de la fracción mononuclear mediante selección negativa utilizando bolitas inmunomagnéticas (Kit de aislamiento de células Pan-T, de Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y siguiendo el protocolo de MACSExpress Separator (Miltenyi Biotec) o AutoMACs Pro Separator (Miltenyi Biotec).

Las células T se cultivaron en TexMACS (Miltenyi Biotec) suplementado con 20 UI / ml de IL-2 (Miltenyi Biotec) o 10ng/ml de IL-7 e IL-15 (Miltenyi Biotec) a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/ml. Las células T fueron activadas con T Cell TransAct (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del proveedor. En general, 10^6 células en 700 μ l de medio TexMACS suplementado en un pocillo de placa de 48p (0.98cm^2) durante 48h.

2. PLÁSMIDOS Y VECTORES LENTIVIRALES UTILIZADOS

2.1 Vectores reporteros GFP

A continuación, se indican los plásmidos utilizados en la presente tesis disponibles ya en nuestro laboratorio, que expresan *enhanced* GFP.

VLs constitutivos: los VLs auto-inactivados de segunda generación SE (Martín *et al.*, 2005), CEWP (Benabdellah *et al.*, 2011), EFEWP (nuestro laboratorio), utilizan los promotores SFFV (virus formador de focos esplénicos), CMV (citomegalovirus) y EF1 α , (factor de elongación-1) respectivamente para la expresión de eGFP.

VLs auto-inactivados de segunda generación basados en promotor WAS: los VLs auto-inactivados de segunda generación WE albergan 0.5kb del promotor proximal WAS (Martín *et al.*, 2005) y VLs AWE incluyen 0.5kb del promotor proximal WAS y 0.38 kb del promotor alternativo (Toscano *et al.*, 2008).

VLs auto-inactivados de segunda generación inducibles por doxiciclina: vectores CEST y CESTIs2 (Benabdellah *et al.*, 2011) y CEET, CEETIs2 (Benabdellah *et al.*, 2016).

2.2 Construcción de los vectores que expresan eGFP-NanoLuc

Vector SELWP. Se diseñó un fragmento eGFP-P2A-NanoLuc que incluía la secuencia de *enhanced* GFP (disponible en nuestro laboratorio), una secuencia NanoLuc obtenida de GeneBank: JQ437370 (nucleótidos 100-616) y, una secuencia P2A, flanqueado por los sitios de

restricción AscI/SbfI. Fue sintetizado por Genscript (Genscript USA Inc. NY, USA). El fragmento eGFP-P2A-NLuc fue clonado en el vector SEWP (disponible en el laboratorio) mediante digestión de ambos con las enzimas AscI y SbfI (New England) en buffer CutSmart (New England) a 37°C durante 1h y 30 min. Se aislaron los correspondientes fragmentos de un gel de agarosa ultrapura y se ligaron utilizando T4 ligasa toda la noche a 16°C. Con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes *E. coli* Stbl3 (*Life Technologies*) y se chequearon las colonias positivas mediante PCR de colonias. Para ello se utilizó el kit KAPPA Taq PCR (*Kappa Biosystems*) y los oligonucleótidos (*Sigma*): SSFV-Fw (5'-GTCCTCCGACAGACTGAGTC) y WPRE-Rv (5'-CGTAAAAGGAGCAACATAGT). De las colonias positivas se hizo una *miniprep* usando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*) y los plásmidos fueron chequeados por digestión con las enzimas de restricción HindIII y AscI y AsiSI (*New England Biolabs*), así como por secuenciación.

Vectores CELET y CELETIS2

Para la construcción de los vectores CELET y CELETIS2, el fragmento eGFP-P2A-NLuc fue clonado en los vectores CEET y CEETIS2 respectivamente (Benabdellah *et al.*, 2016) mediante digestión del fragmento y ambos plásmidos con las enzimas AscI y SbfI, y finalmente ligando los fragmentos de interés con la T4 ligasa. Análogamente al protocolo anterior, se transformaron bacterias competentes y se chequearon las colonias positivas para ambas construcciones mediante PCR de colonias, utilizando los oligonucleótidos (*Sigma*): CMV-Fw (5'-CGGTGGGAGGTCTATATAAGC) y GFP-Rv (5'-CGTCGTCCTTGAAGAAGAT). Se realizaron mini-preparaciones de las colonias positivas, y se chequearon por patrón HindIII y por secuenciación.

2.3 Vector para la sobreexpresión de CD19

Vector EhCD19. Para la construcción del vector EhCD19, se utilizó la plataforma ofrecida por VectorBuilder, utilizando un esqueleto lentiviral derivado de un sistema lentiviral de tercera generación optimizado para expresar la secuencia del cADN CD19 humano (NCBI Gene ID: 930) bajo el promotor EF1 α .

2.4 Construcción del vector basados en ARI-0001

Vector AWARI. Para la generación de AWARI LV, el promotor AW se obtuvo mediante la digestión con las enzimas ClaI/BamHI a partir del vector AWE (Frecha *et al.*, 2008), toda la noche a 16°C, y se insertó en el vector ARI-0001, amablemente cedido por los Dr. Manel Juan Otero y la Dra. Castilla (Castilla *et al.*, 2019) reemplazando al promotor EF1 α .

Se transformaron bacterias competentes *E. coli* Stbl3 (*Life Technologies*) y las colonias positivas fueron chequeadas con los oligos de Fw cPPT-clínico (5'-GTGCAGGGGAAAGAATAGTAG-

3') y Rv CD19 (5'-TACAGGACTTTCTTTCTGCC-3'). Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico y fueron chequeadas por patrón HindIII y por secuenciación.

2.5 Vectores Lent-On-Plus que incluyen diferentes elementos aisladores

El elemento IS2, que combina el fragmento HS4-650 y el SAR2, fue diseñado y sintetizado como se describió previamente en (Benabdellah *et al.*, 2014)

El CEETIS2 (LTR-fuera) y CEET-SAR2 (LTR-fuera) se generaron insertando el elemento IS2 en el sitio XhoI único del CEET y el elemento SAR2 en el sitio KpnI único del CEET (Datos de Cortijo-Gutierrez et al.)

Los vectores CEETln2 HS4_650, CEETln2 Core_Ext, CEET-SAR1, CEET-INFBSAR, CEET-INFbIgKSAR se generaron mediante la inserción de los elementos cHS4_650, cHS4_Extended, SAR1, INFBSAR e INFbIgKSAR2 en el sitio único KpnI del CEET (Datos de Cortijo-Gutierrez et al.)

2.6 Construcción de los vectores basados en CAR3G

Vectores iCAR e ICARIs2. Para la generación de los plásmidos CAR inducibles partimos del plásmido del CAR de tercera generación (3G) constitutivo (comprado a *Creative Biolabs*) y lo digerimos con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI para liberar el fragmento que codifica para el CAR-T2A-EGFRt, y lo introducimos en el plásmido pUC19, digerido con las mismas enzimas, mediante ligación con la ADN ligasa T4 y en una proporción 2:1. Una vez comprobamos por digestión que habíamos conseguido este subclonaje, a continuación introdujimos el CAR en los plásmidos diana, CEET y CEETIs2, para obtener los plásmidos iCAR e ICARIs2, respectivamente. Para ello digerimos ambos plásmidos y el plásmido pUC19-CAR con las enzimas de restricción AscI y SbfI (*New England Biolabs*). En este caso la ligación se llevó a cabo en una proporción 7:1.

Chequeamos las colonias positivas para ambas construcciones mediante PCR de colonias, utilizando los oligos (*Sigma*): CMV-Fw (5'-CGGTGGGAGGTCTATATAAGC) y CD19-Rv (5'-TACAGGAGTTTCTTTCTGCC). Al igual que hemos descrito anteriormente, las colonias positivas fueron crecidas en una minipreparación y se corroboró la adecuada construcción de ambos vectores mediante digestión con HindIII y AscI y SbfI y secuenciación.

3. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

3.1 Maxiproducción de plásmidos para la producción de virus

Para la maxiproducción de plásmidos, se transformaron bacterias competentes *E. coli* Stbl3 (*Life Technologies*), y se seleccionó una colonia única. Se realizó una *miniprep* usando el kit Wizard®

Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*), y se digirió con HindIII para comprobar la amplificación del plásmido correcto. Posteriormente, se realizó un cultivo del clon de bacterias a gran escala (generalmente 250-500 ml) en agitación a 300 rpm y 37 °C durante toda la noche. A partir de este cultivo, se obtuvo una maxipreparación de plásmido, realizando el último paso en esterilidad usando el kit NucleoBond Xtra Maxi EF (*Macherey-Nagel*). Dicha preparación fue cuantificada utilizando el NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Fisher*), con ratios de absorbancia de 260:280 y 260:230 nm libres de contaminación cruzada. La maxiproducción del plásmido se corroboró por digestión enzimática, usando HindIII (*New England Biolabs*). Se realizaron alícuotas a 1 µg/µl y se almacenaron a -20°C.

3.2 Producción y titulación de vectores lentivirales

Los VLs se generaron mediante co-transfección de células HEK-293T con el plásmido de interés transferencia que contiene la secuencia de interés, el plásmido empaquetador pCMVDR8.91 y el plásmido de la envuelta VSV-G p-MD-G (http://www.addgene.org/Didier_Trono). Las células 293T deben tener un bajo pase celular y estar en crecimiento exponencial con una confluencia del 90% en el momento de la transfección. La mezcla de plásmidos, en proporción 10:7:3 respectivamente, se mezclaron en medio DMEM sin suero. Inmediatamente, se mezcla con el agente transfectante polietilenimina (PEI) y se incuban 20 minutos a temperatura ambiente, para después añadir la mezcla gota a gota sobre las células. A las 5 horas post- transfección, se realiza un cambio de medio. El sobrenadante viral se recoge a 24, 48 y 72 horas después de la transfección. En el caso de los VLs con título menor de 10⁷ UT/ml y de uso en células T primarias, se concentran por ultracentrifugación, utilizando la ultracentrífuga Optima, y el rotor SW32Ti (*Beckman Coulter*) a 90.000g durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, aquellos virus de aplicación a células T primarias son resuspendidos en TexMACS y se almacenaron a -80°C.

Los títulos virales se determinaron transduciendo células Jurkat con diferentes diluciones de sobrenadante viral. El porcentaje de células positivas se determinó mediante citometría de flujo y se estimaron las unidades transductoras por ml (UT/ml) de acuerdo con la fórmula: (10⁵ células en placa x % de células positivas) / ml de LV.

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

A raíz del título viral, se puede calcular la multiplicidad de infección (MOI):

$$\text{MOI} = \frac{N^{\circ} \text{ de células transducidas}}{N^{\circ} \text{ de partículas virales}}$$

4. TRANSDUCCIÓN

4.1 Transducción de células T primarias

Las células T primarias previamente activadas utilizando T Cell TransAct (Miltenyi Biotec) fueron transducidas con los diferentes VLs y MOI mediante espinoculación (800g durante 60 minutos a 32°C). A las 5 horas de incubación en presencia de los VLs, las células fueron lavadas con PBS 300g 10 min y sembradas a una densidad de 10^6 c/ml en medio TexMACs suplementado. El porcentaje de células transducidas fue determinado mediante citometría de flujo al menos 72h post-transducción.

4.2 Transducción de células procedentes de líneas celulares

Para la transducción de las líneas celulares en suspensión, se incubaron 10^5 células con diferentes VLs en un pocillo de una placa de 48p en un volumen máximo de 300ul. En el caso de las células Jurkat, la transducción se llevó a cabo mediante espinoculación (800g, 30 min a 32°C). Posteriormente tras 5h de incubación, las células fueron lavadas con PBS 5 min a 300g y sembradas en su medio habitual.

Para la transducción de células adherentes, se incubaron 10^5 células con diferentes VLs en un pocillo de una placa de 24p en un volumen máximo de 400ul. Posteriormente a las 5h, se aspiró el medio con los VLs, se realizó un lavado con PBS y se añadió su medio habitual.

El porcentaje de células transducidas fue determinado mediante citometría de flujo al menos 72h post-transducción.

4.3 Determinación de número de copias del vector por célula

Se extrajo el ADN genómico haciendo uso del kit comercial QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Para la qPCR se utilizó el kit QuantiTect™ SYBR Green PCR (Qiagen) y ADN genómico con una sola copia de vector (obtenido de un modelo generado previamente en el laboratorio) para la curva patrón. Se utilizaron depositaron 60 ng de ADN genómico (que equivale a 10000 células) de cada muestra por duplicado. Para cuantificar la integración de los vectores lentivirales se usaron los oligonucleótidos para la secuencia LTR (Fw LTR: 5' GATCTGCTTTTTGCTTGTACT 3'; Rv LTR: 5' GAGTCCTGCGTCGAGAGAG 3', Tabla 12). Como control del número de células cargado en cada pocillo se usaron también oligos frente al gen de la albúmina humana (Fw albúmina: 5' GCTGTCATCTCTTGTGGGCTG 3'; Rv albúmina: 5' ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC 3'. Tabla 12). La reacción se llevó a cabo en el sistema Stratagene MX3005P (Agilent) y usando el programa: 1x (95°C, 3min); 40x (95°C, 3 seg / 60°C, 30 seg); 1x (72°C, 2 min). Finalmente, el número de copias/célula fue calculado mediante la interpolación en la curva patrón usando el programa MxPro (Agilent).

5. GENERACIÓN DE LOS MODELOS TUMORALES CD19+

Para la generación de los modelos CD19+, transdujimos 2×10^5 células Nalm6, Namalwa y MiaPaCa2 con 20 μ l de nuestro vector SELWP en una placa de 48p (Nalm6 y Namalwa) y 24p (para las células MiaPaCa2) durante 5h, para que conseguir la expresión GFP y Nanoluc.

Posteriormente, las MiaPaCa2 se transdujeron con 20 μ l del vector EhCD19 para que sobreexpresaran también CD19 en la membrana. Todas las células fueron expandidas y sorteadas mediante FACS con el sorter FACSAria™ Fusion (*BD Biosciences*). Además, las células MiaPaCa2-CD19+ fueron marcadas con un anticuerpo antiCD19-APC, se resuspendieron en tampón de sorteo (PBS + 2% suero bovino fetal + 5 mM de EDTA +2% P/S) a una densidad de 10×10^6 células/ml y un volumen final de 2 ml, y se realizó la separación seleccionando las células con una alta expresión tanto de GFP como de CD19.

6. CITOMETRÍA DE FLUJO

Toda la información de los anticuerpos usados en esta tesis se recoge en la tabla 10.

6.1 Tinción extracelular directa

Para el fenotipado directo, las células T fueron lavadas con PBS (400g 5 min) e incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales durante 30 min en hielo y oscuridad: CD45RA-PE /FITC (HI-100), CD62L-PE-Cy7 (DREG56), CD3-PerCP-Cy5 / APC-780 (OKT3), PD1-APC (MIH4), LAG-3-PE (3DS223H), TIM-3-APC-Cy7 (F38-2E2) todos de eBioscience (*Thermo Fisher*). Posteriormente fueron lavadas (400g 5 min) antes de su adquisición en los citómetros FACSCanto II o FACS Verse (*BD Biosciences*).

6.2 Tinción del CAR

La expresión de CAR se determinó con anticuerpo IgG1 de cabra que reconoce específicamente la región Fab murina, con un SP largo conjugada a biotina (115-065-072, Jackson Immunoresearch, EE. UU., Filadelfia, PA, EE. UU.), seguida de la unión a estreptavidina conjugada con APC Thermo Fisher Scientific, EE. UU., Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Brevemente, al menos 50 000 células fueron lavadas con PBS (400g 5 min) y bloqueadas con FcR Blocking (Miltenyi, 1:150) durante 20 min en hielo. Tras un lavado con PBS+ 2% albumina de suero bovina y 2mM EDTA, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-Fab murino (1:100) durante 1 hora en hielo. Tras un lavado con PBS+ 2% albumina de suero bovina y 2mM EDTA, se añadió la estreptavidina-APC (1:330) durante 15 minutos y posteriormente, se añadieron el resto de anticuerpos monoclonales para el inmunofenotipo durante 15 minutos más, todo en hielo y en la oscuridad. Las células fueron lavadas con 2 ml de PBS antes de su adquisición en el citómetro.

6.3 Señalización tónica

La señalización tónica se determinó mediante tinción intracelular con pCD3z-PE (Tyr142, 3ZBR4S), tras la fijación y permeabilización previa con el kit y Fix & Perm Kit (Nordic MuBio, Susteren, Países Bajos). En primer lugar, las células fueron fijadas durante 15 min a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS, se añadió el reactivo B de permeabilización, donde se incubó 15 min en presencia de FcR Blocking (Miltenyi, 1:150). Tras ese periodo, se lavaron con PBS y se incubó con el anticuerpo durante 30 min a RT (1:100) en presencia del reactivo B. Tras un lavado, las muestras fueron fijadas de nuevo con el reactivo A y adquiridas en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences).

6.4 Tinción de muestras de ratón/humano

En el caso de las muestras de ratones, las células fueron lavadas con PBS (400g 5 min) y se bloquearon los receptores Fc γ con anti-CD16 / CD32 murino (eBioscience, ThermoFisher) y suero de ratón al 5% durante 20 min en hielo. Tras un lavado, se procedió a la tinción extracelular directa o combinada para detectar el CAR. Las muestras se lavaron dos veces en el último paso y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% antes de adquiridas en un citómetro FACSCantoII o FACS Verse (BD Biosciences).

El porcentaje de células Namalwa-GFP-Nluc y células T (hCD3+) supervivientes se determinó por FACS estableciendo la región "singletes" y, dentro de ésta, "células humanas", que se estableció previamente tras adquirir un cocultivo de células Namalwa y células T humanas utilizadas como control.

7. ENSAYOS FUNCIONALES

7.1 Análisis de proliferación con tinción de CFSE

Para el estudio de la proliferación celular, se conjugaron las células T con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) (ThermoFisher). Para ello, se resuspendieron las células en 1 ml de medio TexMACs. Por otro lado, el CFSE fue diluido a una concentración final 5 μ M en PBS y añadido a las células durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para eliminar el exceso de CFSE, se realizaron 3 lavados con PBS + 10% de albúmina humana (*Grifols*) a 300g, 20°C durante 10 minutos. Posteriormente se estimularon con TransAct para inducir la proliferación y se realizaron medidas en el citómetro FACSCanto II (*BD Biosciences*) a diferentes tiempos.

7.2 Análisis de la cinética de expresión de los diferentes VLs en células T

Para las células T transducidas con los VLs-GFP, se estimularon 10^5 células T con T cell TransAct (Miltenyi Biotec) después de 10 días de reposo tras la activación inicial necesaria para la transducción. De manera similar, se estimularon 10^4 células CAR-T transducidas con 10^4 células CD19+ Namalwa-GFP-NLuc para simular el eje de señalización CAR /TCR en placas de 96 pocillos con fondo en U. La expresión de eGFP o CAR fue determinada a diferentes tiempos después de la estimulación.

Todas las células fueron teñidas con anti-CD3 y en el caso de las células CAR-T, la expresión del CAR fue también determinada. El concepto de “expresión” se indica como la proporción de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MeFI) de la población positiva (eGFP o CAR) frente al MeFI de la población total no transducida. La “variación relativa” indica el cociente de expresión o de porcentaje relacionado con esos valores respecto a nivel basal a 0h.

7.3 Secreción de citocinas de células CAR-T

Para analizar la producción de citoquinas después de la estimulación de las células T, se cultivaron conjuntamente 5×10^4 células CAR-T con células diana Namalwa-GFP en una proporción de 1:1 en TexMACs sin suplementar. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y se congelaron a -80°C . Los niveles de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ fueron determinados con anti-TNF- α humano Ready-SET-Go! Kit de Affymetrix (eBioscience) y ELISA MAX Deluxe Set (Biolegend, USA, San Diego, California, USA) respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron diluidas 1:10 en medio TexMACs antes de su cuantificación con los respectivos kits.

7.4 Ensayo de citotoxicidad

Las células diana en suspensión, Namalwa y Nalm6 GFP-NLuc+, y las células no diana (CD19-) se co-cultivaron a una concentración de 5×10^3 células por pocillo por duplicado en placas de 96 pocillos con fondo en U, y se incubaron con linfocitos T expresando el CAR en diferentes ratios efector:diana (células T-CAR+:células CD19+, E: T) (0,5: 1, 1: 1, 2: 1) en medio TexMACs no suplementado durante 16 o 48 horas, según se indique. En el caso de los ensayos de citotoxicidad con las células adherentes MiaPaCa2 GFP-NLuc, se plaquearon $1,5 \times 10^4$ células CD19+ y CD19- por pocillo de 96 en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% P/S. Tras 24 horas, se aspiró el medio y se cocultivaron las células pancreáticas con células CAR-T (ratio 10:1 / E:T) en medio TexMACS no suplementado durante 48 horas.

El porcentaje de lisis de células diana CD19+ se determinó mediante citometría de flujo como pérdida de GFP, respecto a la lisis basal producida por células T no transducidas. La lisis específica se determinó de la siguiente manera:

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

7.5 Ensayo de persistencia con células MiaPaCa2 CD19+ GFPNluc+

Para comparar la respuesta a antígeno de las diferentes células T-CAR, así como su evolución fenotípica y funcional, se realizó un ensayo de persistencia plaqueando a tiempo cero $1,5 \times 10^4$ células pancreáticas CD19+ y CD19- en pocillos de una placa de 96 con un volumen final de 200 μ l de DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% P/S. A las 24 horas, se aspiró el medio y se realizó el cocultivo con las células T-CAR en una proporción 10:1 (E:T) en medio TexMACS suplementado con IL-7 e IL-15. A las 48 horas, las células T-CAR fueron analizadas para la expresión de marcadores fenotípicos y de agotamiento por FACS. De nuevo, las células T supervivientes fueron enfrentadas en ratio (10:1) a células pancreáticas CD19+ y CD19- hasta un total de 3 encuentros.

8. ANÁLISIS DE INDUCIBILIDAD Y REVERSIÓN

8.1 Preparación de doxiciclina y tetraciclina

El hidrato de doxiciclina y la tetraciclina (Sigma Aldrich) fueron disueltos en agua esterilizada para cultivos y se hicieron alícuotas a una concentración stock de 10 μ g/ml para su almacenamiento a -20°C . Una vez descongeladas, las alícuotas se mantuvieron a 4°C durante un máximo de 7 días en oscuridad. Para administración oral, se añadió Doxiciclina a la gelatina de fresa (para preparación infantil) disuelta en agua estéril procedente de los biberones y se dejó solidificar a 4°C en oscuridad.

8.2. Cálculo de la inducibilidad

La fórmula de la inducibilidad considera porcentaje, mediana de intensidad de fluorescencia y *leaking* (expresión en ausencia de Dox). Se restó el fondo de las células no transducidas (NT). La inducibilidad (representada también en la Figura 33) se calculó de la siguiente manera:

$$Inducibilidad = \frac{\% eGFP + (Dox +) \times MeFI\ de\ la\ región\ eGFP + (Dox+)}{\% eGFP + (Dox -) \times MeFI\ de\ la\ población\ total (-Dox)}$$

8.3 Reversión

Para determinar la reversión, las células fueron lavadas 3 veces con 10 ml de PBS a 200g durante 10 minutos cada 24h, y tomada una muestra para su adquisición previa al lavado para determinar la expresión de eGFP por citometría.

9. MODELOS ANIMALES Y ANÁLISIS DE BIOLUMINISCENCIA

9.1 Modelo animal de linfoma de Burkitt humano

Se inocularon ratones NOD / scid-IL-2Rnull (NSG) de 10 a 12 semanas de edad por vía intravenosa con 3×10^5 células Namalwa-GFP-NLuc por ratón. A los tres días, se realizó un análisis de bioluminiscencia para determinar aquellos que contenían células tumorales. Tras la aleatorización, se infundieron las células CAR-T ARI /AWARI (5×10^6 o 1×10^7), células T no transducidas (5×10^6 o 1×10^7), o PBS en la vena de la cola.

En la segunda comparativa, con la intención de mimetizar una recidiva y nueva exposición al antígeno, inoculamos una nueva dosis de 3×10^5 células Namalwa-GFP-NLuc. Se inocularon nuevos ratones “PBS”, sin células T, para evaluar la progresión tumoral de esta segunda exposición. Esto permitirá una comparación pareada entre los diferentes tratamientos (cada uno comparado con el control y cada uno comparado entre sí). El control de la progresión tumoral se determinó dos veces a la semana mediante bioluminiscencia.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical en los días indicados, o cuando se aplica el criterio de punto final humanitario (pérdida del 20% del peso o parálisis de patas traseras). Se tomaron muestras de sangre, médula ósea, hígado, bazo y cerebro. La sangre se extrajo por punción cardíaca directa post-sacrificio y se diluyó 1/5 en EDTA. Las células del hígado y del bazo se obtuvieron por disrupción mecánica y las de la médula ósea por perfusión de ambos fémures y tibias. Las células del cerebro se obtuvieron tras la su homogenización y separación en gradiente de Percoll. Todas las suspensiones celulares fueron disgregadas tras pasar por un filtro de $40 \mu\text{m}$ antes de la tinción para citometría.

9.2 Modelos inducibles *in vivo*

Para la generación de los modelos inducibles, se inocularon en ratones NSGs por vía intravenosa 10^6 células Jurkat o $0,2 \times 10^6$ Namalwa transducidas con vectores inducibles. Para el modelo MiaPaCa2, se inyectaron por vía subcutánea $0,15 \times 10^6$ células mezcladas en 1: 1 v/v con Matrigel en el flanco izquierdo de ratones NSG. La doxíciclina se administró por vía oral disuelta en gelatina y se proporcionó dos veces por semana para su absorción *ad libitum*.

Tras el sacrificio de los ratones inoculadas con células Jurkat y Namalwa, la médula ósea fue procesada para citometría y teñida con anti-CD3 humano y anti-CD19 humano respectivamente para determinar las poblaciones humanas infiltradas. Como control de la región FSC y SSC, y región de células humanas se utilizaron células en cultivo de cada tipo celular.

9.3 Bioluminiscencia *in vivo*

Para el análisis de bioluminiscencia, se diluyó furimazina (Nano-Glo, Promega) a 1/60 en PBS y se inyectó por vía intraperitoneal inmediatamente antes de la adquisición en un analizador de espectro IVIS (Caliper, Perkin Elmer). Las imágenes se adquirieron durante 180 segundos, en campo abierto, y se analizaron utilizando Living Image 3.2 (Perkin Elmer) o AURA Imaging Software 3.2 (Spectral Instruments Imaging). El sustrato diluido es estable entre 2-3h a temperatura ambiente.

10. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE CÉLULAS T-CAR EN EL BIORREACTOR CLINIMACS PRODIGY EN CONDICIONES SIMILARES A GMP

La producción a gran escala de células T-CAR en el CliniMACs Prodigy se llevó a cabo en condiciones similares a las GMP en salas blancas de Terapia Génica-Celular de la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Allí, se descongelaron dos aféresis diferentes de un donante sano y se inocularon alrededor de 1×10^8 células T en el biorreactor CliniMACs Prodigy (Miltenyi Biotec). Se seleccionaron células CD4 y CD8 usando CD8 y CD4 GMP Reagent (Miltenyi Biotec), se cultivaron con 10 ng/ml IL-7 / IL-15 GMP (Miltenyi Biotec) y se activaron con α CD3/ α CD28 GMP T cell TransAct (Miltenyi Biotec). En el día 2 del proceso, estas células se transdujeron con el vector lentiviral AWARI (MOI = 5). Las células se cultivaron en medio TexMACs GMP que contenía IL-15 e IL-7 de grado GMP (Miltenyi Biotec) durante 9 ó 10 días. El producto final se recogió con 100 ml de NaCl al 0,9% + albúmina de suero humano (HSA) al 0,5%.

Las células se tiñeron con CD3-APC, CD4-FITC, CD8-APC Vio770, CD14-PE Vio770, CD45-Vioblue (Miltenyi Biotec). Para evaluar la eficacia de la transducción, el producto fue teñido con CD-19 Biotina y Anti-biotina PE (Miltenyi Biotec). La viabilidad se determinó utilizando 7AAD (Miltenyi Biotec). El fenotipo se determinó con CD45RA-APC (HI100) y CCR7-BV421 (2-L1-A RUO) de BD Pharmingen. Las células se adquirieron en un citómetro MACsQuant (Miltenyi Biotec) y se analizaron con el software de análisis MACsQuantify (Miltenyi Biotec).

11. EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA

Se extrajo el ARN de aproximadamente 7×10^5 células usando Trizol (Ambion). Posteriormente el ARN fue cuantificado y se partió de la misma cantidad para la retrotranscripción del mismo, usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (ThermoFisher), suplementado con un inhibidor de ARNasa (ThermoFisher). La qQ-PCR se realizó en un sistema Stratagene MX3005P (Agilent), utilizando Kappa SYBR FAST pPCR Master Mix (Kappa Biosystems) y oligos frente a GFP y CD3 (secuencias de los oligos adjuntados en Tabla 12). Los resultados se

relativizaron frente al gen endógeno GAPDH (Tabla 12). El programa utilizado fue el siguiente: 1x (95°C, 15 min); 40x (95°C, 15 seg / 60°C, 30 seg / 72°C, 30 seg); 1x (95°C, 1 min / 55°C, 30 seg / 95°C, 30 seg). Los datos fueron analizados con el programa MxPro (Agilent) calculando los cambios relativos de expresión génica utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

12. ANÁLISIS DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Se analizaron las secuencias de los promotores EF1 α y el promotor AW con las herramientas Bioinformáticas PROMO y Alibaba2.1 para la identificación de sitios de unión de factores de transcripción putativos (TFBS) definidos en la base de datos TRANSFAC. Los parámetros usados en PROMO son la elección de “Factores humanos, con 0% de disimilitud entre matriz”. Análogamente, en Alibaba2.1, se seleccionaron aquellos sitios con “100% de predicción y mínimo de conservación del 80%”. Los resultados de ambos programas se incluyeron en un diagrama de Venn, utilizando el programa InteractiVenn, para analizar aquellos que son comunes entre ambos promotores.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos fueron generados con GraphPad 1.6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Los datos son expresados como media \pm SEM y en el caso de la intensidad de fluorescencia, como mediana \pm SEM. Los test estadísticos utilizados se indican en cada pie de figura.

14. LISTA DE ANTICUERPOS, SECUENCIAS Y SOFTWARE

Tabla 10. Anticuerpos

Anticuerpo	Clon	Conjugación	Concentración	Casa comercial
α CD3	OKT3	PerCP-Cy5.5/APC-780	1:200	ThermoFisher
α CD45RA	HI-100	FITC / PE	1:200	ThermoFisher
α CD62L	DREG56	PE-Cy7	1:200	ThermoFisher
α PD1	MIH4	APC	1:100	ThermoFisher
α LAG3	3DS223H	PE	1:100	ThermoFisher
α Tim3	F38-2E2	APC-e780	1:100	ThermoFisher
α Fab-murino, SP-IgG	-	Biotina	1:100	Jackson Immunoresearch
Streptavidina	-	APC	1:330	ThermoFisher
α EGFR	AY13	PE	1:100	Biolegend
α CD19	HIB19	APC	1:200	ThermoFisher
α Phospho-CD3z (Tyr 142)	3ZBR4S	PE	1:100	ThermoFisher

Tabla 11 Software utilizado

Software	Aplicación	Casa comercial
FlowJo V7.10	Análisis FACS	TreeStar, BD, EE. UU.
MACsQuantify	Análisis FACS	Miltenyi Biotec, Alemania.
MxPro	Análisis qPCR	Agilent, EE. UU.
AURA Imaging Software 3.2	Análisis bioluminiscencia en ratones	Spectral Instruments Imaging, EE. UU.
Living Image 3.2	Análisis bioluminiscencia en ratones	Perkin Elmer, EE. UU.
PROMO2 (basado en TRANSFAC 8.3)	Análisis de los sitios de unión de factores de transcripción	Académico: Universitat Pompeu Fabra y Universitat Politècnica de Catalunya
Alibaba2 (basado en TRANSFAC 4.0)	Análisis de los sitios de unión de factores de transcripción	Académico: Universität Heidelberg
GraphPad 1.6	Análisis estadísticos	GraphPad Software Inc, EE. UU.
InteractiVenn	Diagrama de Venn	Académico: Universidade de São Paulo, Laboratório Nacional de Biociências, Embrapa Informática.
BioRender	Elaboración de figuras representativas	BioRender.com

Tabla 12 Lista de oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
Fw GFP	AAGCTGACCCTGAAGTTCAT
Rev GFP	CGTCGTCCTTGAAGAAGAT
Fw GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG
Rev GAPDH	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
FW CPPT Clínico	GTGCAGGGGAAAGAATAGTAG
Rev-CD19	TACAGGAGTTTCTTTCTGCC
FW-CMV	CGGTGGGAGGTCTATATAAGC
Fw CD3	AAGATGAAGTGGAAGGCG
Rev CD3	CTCAGGAACAAGGCAGTG
Fw SFFV	GTCCTCCGACAGACTGAGTC
Rev WPRE	CGTAAAAGGAGCAACATAGT

RESULTADOS

RESULTADOS: PARTE I

DESARROLLO DE LAS HERRAMIENTAS NECESARIAS PARA LA GENERACIÓN DE CÉLULAS CAR-T FRENTE A TUMORES CD19+

1.1 AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS T PRIMARIAS DE DONANTE SANO.

Las células T primarias de sangre periférica de donante sano fueron aisladas mediante un gradiente de Ficoll para obtener las células mononucleares (PBMCs del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) y posteriormente realizamos un aislamiento de las células T por selección de negativa magnética (M&M), obteniendo una pureza de células CD3+ mayor del 85% ($88.7 \pm 5.3\%$, media \pm SEM) (**Figura 12A**). Las células T CD3+ aisladas fueron cultivadas en un medio libre de suero (TexMACs) suplementado con 20 UI/ml de IL-2 (40 ng/ml) (**Figura 12 B, arriba**) y activadas durante 48h con una nanomatriz anti-CD3/CD28 (TransAct), que mimetiza la estimulación vía TCR, (**Figura 12 C, arriba**) lo que favorece su crecimiento en una forma de rosetas característica durante la primera semana de cultivo (**Figura 12 B, abajo**). Observamos que toda la población inicial (color gris) se dividió entre 1-3 veces a las 24h, definido por la pérdida de intensidad de fluorescencia del CFSE (**Figura 12C, histograma azul**). A las 96h, todas las células se han dividido un mínimo de 4 veces, incluso hasta acumulando hasta 8 divisiones (**Figura 12 C, histograma verde**), lo que indica una adecuada proliferación. Con la intención de determinar el grado de diferenciación de estas células en cultivo, utilizamos dos marcadores CD45RA y CD62L para poder establecer cuatro poblaciones: T_{SCM}/T_{Naïve} (CD45RA+CD62L+), T_{CM} (CD45RA-CD62L+), T_{EM} (CD45RA- CD62L-) y T_{EF} (CD45RA+CD62L-). Así, observamos que las células cultivadas durante 30 días no tenían un fenotipo meramente efector, si no que aún permanecían poblaciones memoria (**Figura 12D**).

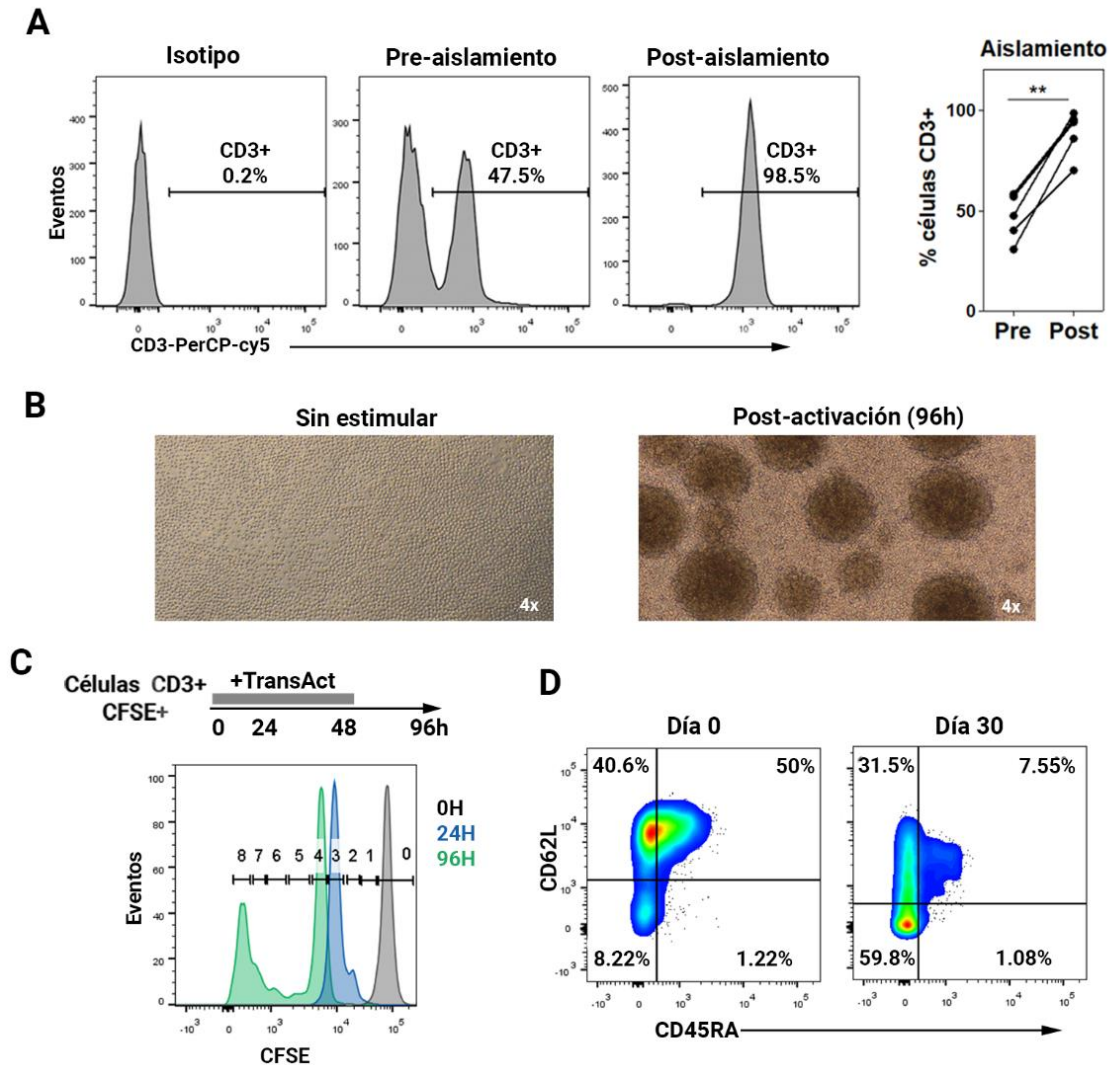


Figura 12. Eficiencia de aislamiento de las células T primarias y óptima activación con la nanomatrix anti-CD3/CD28. A) Izquierda: Histogramas de CD3 de células T antes y después del aislamiento por selección negativa magnética. Derecha: gráfica de la eficiencia de aislamiento de cuatro donantes independientes. **, indica $p < 0.001$, test no paramétrico, dos colas. B) Imágenes de células T sin estimular (arriba) y tras 96h post-activación (abajo) con TransAct. C) Arriba: diagrama de células T sin estimular y teñidas con CFSE reciben una estimulación de 48h con TransAct y posteriormente se lavan. Abajo: histograma de CFSE donde se indican las células sin dividir (gris), divididas a 24h (azul) y divididas a las 96h (verde) además del número de picos. D) Dot-plot representativo de CD45RA y CD62L de células recién aisladas y a día 30 de cultivo.

1.2 OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS T PRIMARIAS CON VLs PARA UNA MODIFICACIÓN GENÉTICA ESTABLE.

A continuación, analizamos las mejores condiciones para conseguir transducción eficiente de las células T cuando se utilizan VLs pseudotipados con VSV-G. Para ello, utilizamos

un VL reportero disponible en laboratorio, SE, que expresa GFP bajo un promotor viral fuerte (del virus *spleen focus forming virus*). Tras el aislamiento, activamos las células T con TransAct y transdujimos a las 24h, 48h y 72h con el sobrenadante viral a una multiplicidad de infección de 2 (MOI=2) (**Figura 13A**). Observamos que únicamente cuando se activan las células con la nanomatriz se observa una modificación genética eficaz (**Figuras 13B y 13C**). Las eficacias de

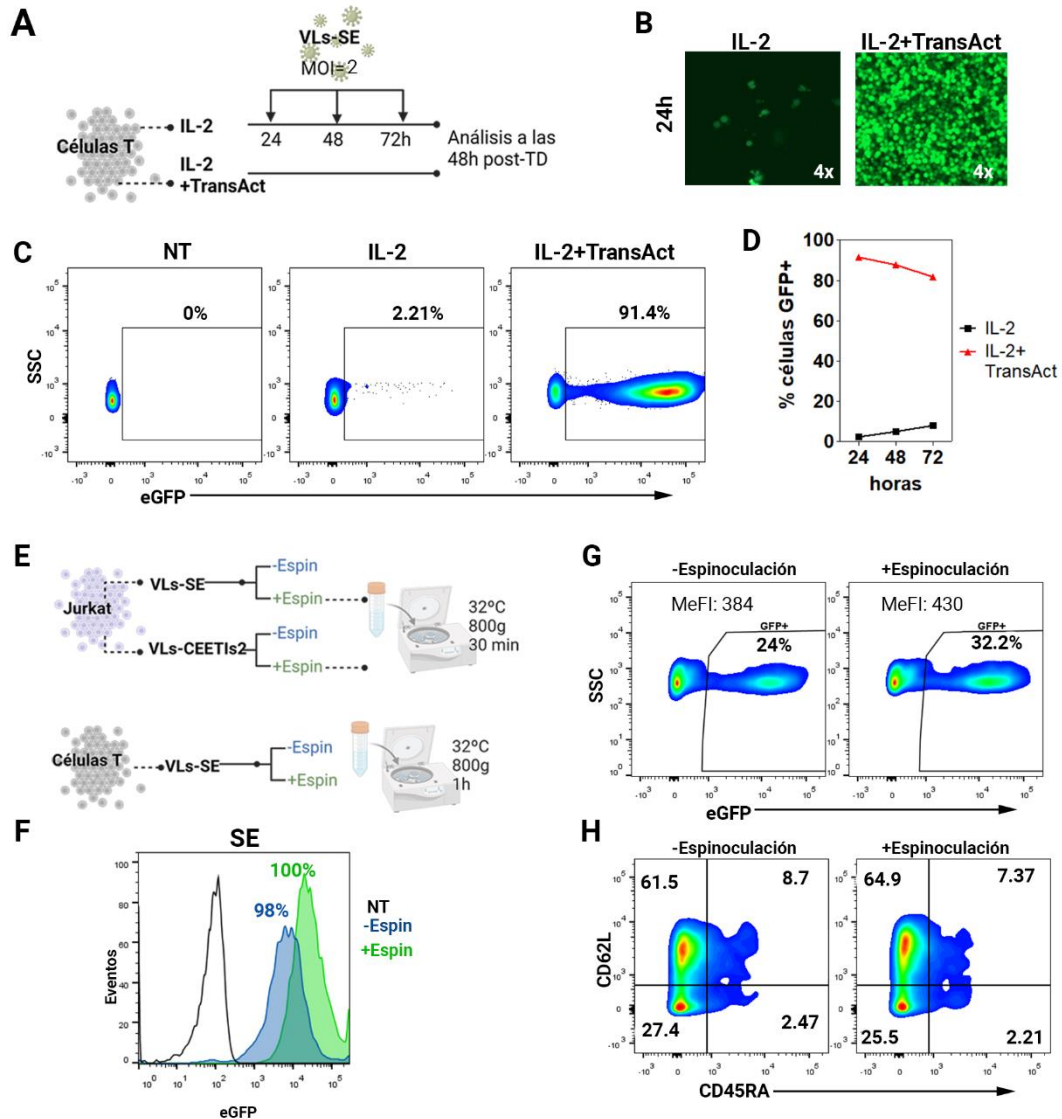


Figura 13. Optimización de la transducción de células T primarias. A) Diagrama del experimento para determinar la transducción a las 24, 48h, 72h en células CD3+ activadas o no con TransAct. B) Imagen de fluorescencia adquirida 48h post-transducción (TD) de células T no estimuladas (IL-2) y estimuladas 24h (IL-2+TransAct). C) Dot-plot de las células transducidas con una estimulación de 24h. D) Porcentajes de células GFP+ transducidas con SE estimuladas o no durante 24, 48, 72h. E) Diseño experimental de la espinoculación de células Jurkat (arriba) con los vectores SE y CEETIs2 y células T primarias con el vector SE (abajo). F) Histogramas eGFP de células Jurkat no transducidas (NT), no espinoculadas (azul) y espinoculadas (verde). G) Dot-plot de células T primarias transducidas con SE con o sin espinoculación. F) Dot-plots de la expresión de CD45RA y CD62L de esas células.

modificación genética cuando las transducciones con los VLs-eGFP se realizan a diferentes tiempos (24, 48, 72h) no mostraron diferencias significativas (**Figura 13D**).

Sin embargo, dado que no todos los VLs utilizados en este proyecto son tan eficientes como el VL-SE, intentamos mejorar la eficiencia de transducción basándonos en la bibliografía y utilizando un método llamado espinoculación. Básicamente, la espinoculación consiste en centrifugar las partículas virales junto con las células a 32°C, 800h durante 30 min (en el caso de células Jurkat, **Figura 13E, arriba**) o 1h (para células T primarias). Así, comprobamos la espinoculación utilizando el vector SE generaba un ligero incremento de la transducción (tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia, MeFI), tanto en células Jurkat, un modelo de células T, (**Figura 13F, izquierda**) como en células T primarias (**Figura 13G**). Además, comprobamos que el protocolo de espinoculación en células T primarias parecía no alterar sustancialmente el fenotipo de diferenciación (**Figura 13 H**).

RESULTADOS: PARTE II

DESARROLLO DE MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA DETERMINAR LA LISIS TUMORAL Y EFICIENCIA TERAPÉUTICA

Dado que nuestro objetivo es mejorar las estrategias de inmunoterapia basadas en CAR-T, lo primero es disponer de células diana que podamos identificar fácilmente para determinar el grado de lisis específica y donde podamos estudiar las potenciales mejoras logradas.

Tal y como se ha mencionado previamente, nuestros estudios se centran en leucemias y linfomas B y en mejorar los sistemas α CD19-CAR-T existentes en la actualidad, por lo tanto, debemos disponer de células que sean CD19- y CD19+. En primer lugar, analizamos los niveles de CD19 de diferentes líneas celulares procedentes del linaje B y de otros orígenes para tenerlas como controles (**Figura 14A**). Así, corroboramos los altos niveles de CD19 de las líneas Nalm6, de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y Namalwa, de linfoma de Burkitt, siendo ligeramente más bajo este último. Sorprendentemente, las células K562 (eritro-mieloides) expresaban bajos niveles de CD19 mientras que las células MEG-01S (de linaje megacariocítico) y HL-60 (mieloides) eran negativas (**Figura 14A**).

Para establecer los modelos, en primer lugar, diseñamos un VL (SELWP) que codificaría eGFP y Nanoluciferasa (la luciferasa más pequeña actualmente, de tan sólo 19kDa y con alta penetrancia) en forma de polipéptido y que una proteasa cortará por la secuencia P2A permitiendo

su ensamblaje funcional (**Figura 14B**). Con esta estrategia, podríamos determinar la citotoxicidad *in vitro* de una manera sencilla, midiendo pérdida de fluorescencia GFP por citometría de flujo, además de poder caracterizar las células T mientras que cuantificamos la progresión tumoral *in vivo* gracias a la nanoluciferasa. Generamos los modelos CD19+ transduciendo las células Nalm6 y Namalwa y sorteando para obtener una población GFP+ pura que mantenía los niveles de CD19 (**Figura 14C**).

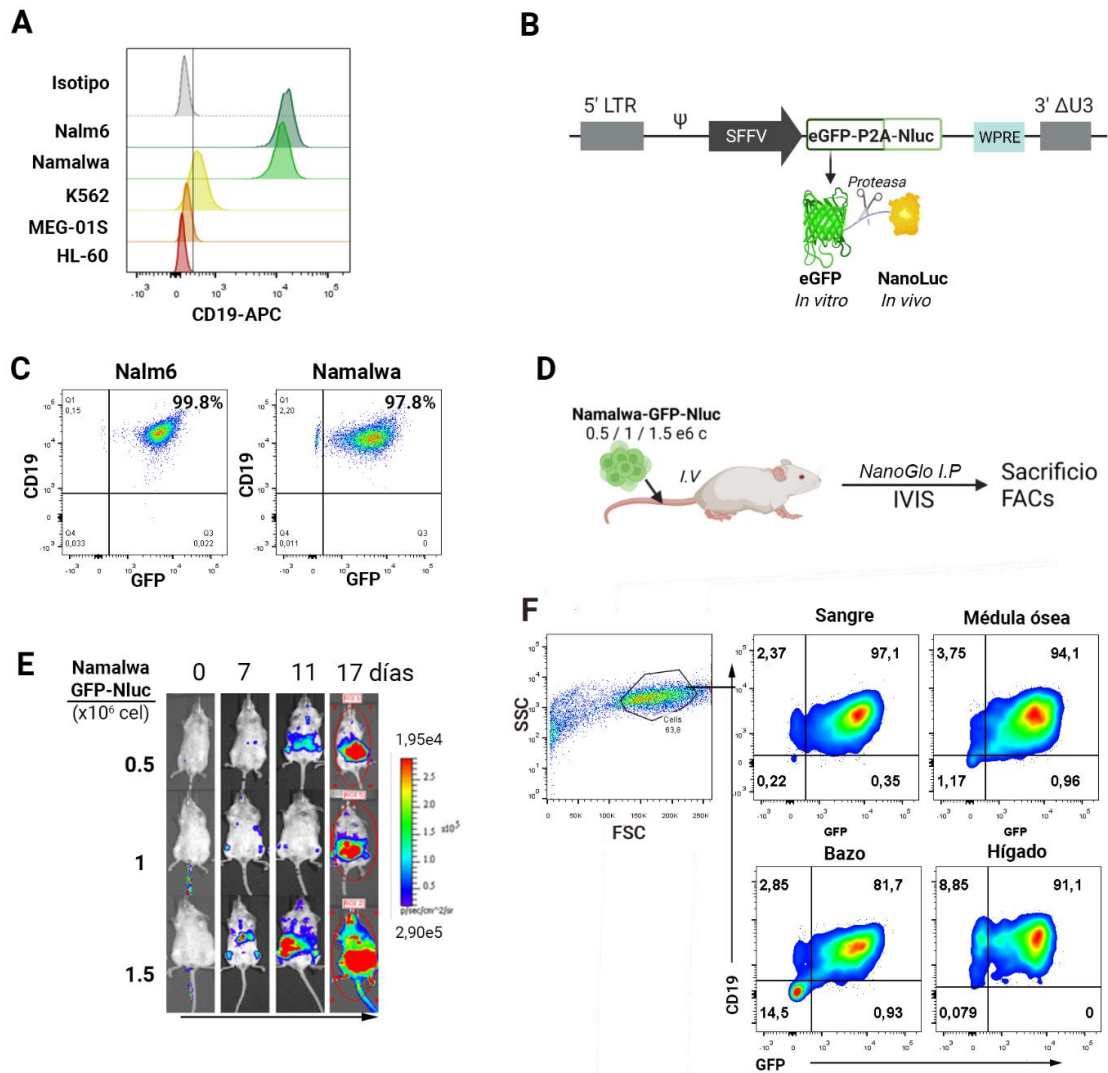


Figura 14. Generación de los modelos CD19+ GFP+Nanoluc+. A) Histograma de los niveles de CD19 en diferentes líneas celulares. B) Esquema del VL-GFP-Nluc (SELWP). C) Dot-plots de los niveles de CD19 y GFP de las células Nalm6 y Namalwa modificadas. D) Diagrama del desarrollo experimental del modelo de ratón NSG-Namalwa-GFP-Nluc. E) Imágenes de bioluminiscencia adquiridas a día 0,7,11 y 17 post-inoculación de las tumorales con tres dosis diferentes. F) Dot-plot representativos del análisis de GFP/CD19 de las células Namalwa presentes en sangre, médula ósea, bazo e hígado de un ratón inoculado inicialmente con 500 000c. Namalwa-GFP-Nluc. Se muestra un dot-plot representativo de FSC/SSC de médula ósea donde se muestra la estrategia de análisis.

A continuación, nos planteamos generar un modelo *in vivo* con las células Namalwa, ya que el linfoma de Burkitt es uno de los más agresivos. Así, inoculamos intravenoso tres dosis diferentes de Namalwa-GFP-Nanoluc en ratones NSG (**Figura 14D**) y realizamos un análisis de bioluminiscencia con el dispositivo IVIS Spectrum a los 10-20 min tras la infusión de las células tumorales (**Figura 14E, día 0**). El sustrato de la NanoLuc, NanoGlo, es administrado intraperitonealmente justo antes de la adquisición de las imágenes y así, podemos observar cómo algunas células tumorales se han quedado en el lugar de la inyección a tiempo 0, y cómo progresan de manera similar en las tres dosis (a mayor dosis, mayor adelantamiento de la enfermedad) colonizando médula, cavidad abdominal, médula, hígado, bazo e incluso cerebro hasta saturar la señal a día 17, con una pérdida del 20% del peso, lo que se establece como punto final humanitario (**Figura 14E**). Finalmente, determinamos por citometría de flujo la infiltración tumoral en sangre, médula ósea, bazo e hígado. Utilizando células Namalwa *in vitro*, determinamos la región FSC/SSC donde deberían aparecer las células en caso de infiltración. Así, observamos un alto porcentaje de CD19+ humano que seguían siendo GFP+ en todos los órganos analizados (**Figura 14F**).

A continuación, desarrollamos un modelo artificial CD19+ *in vitro* derivado de una línea tumoral pancreática con la intención de comparar ambas células ARI y AWARI en un ambiente más hostil e inmunosupresor, donde se necesita una mayor persistencia. Para ello, diseñamos un nuevo VL que iba a expresar CD19 humano bajo el promotor EF1 α (el vector EhCD19).

En primer lugar, generamos la línea celular MiaPaCa2, de carcinoma pancreático metastásico con KRAS mutado, para que expresara nuestro vector reportero SEWLP, GFP+Nluc+ (**Fig. 15 arriba**). En segundo lugar, las volvimos a modificar para que expresaran en superficie CD19 con sobrenadantes virales del VL-EhCD19, de modo que ahora podían ser diana de nuestras células CAR-T anti-CD19 y podíamos monitorizarlas.

Posteriormente, estas células fueron sorteadas para expresar una población pura GFP+ CD19+. Sin embargo, a las dos semanas volvimos a tener una población mixta, donde más del 90% eran GFP+ pero sólo el 40-50% eran GFP+CD19+ (**Fig 15 abajo**). Destacamos que, aunque parece existir un silenciamiento de CD19 o cierta toxicidad en este modelo, resulta interesante ya que mimetiza, desde un punto de vista más realista, la heterogeneidad tumoral donde un porcentaje elevado de las células cancerígenas dejan de expresar el antígeno diana.

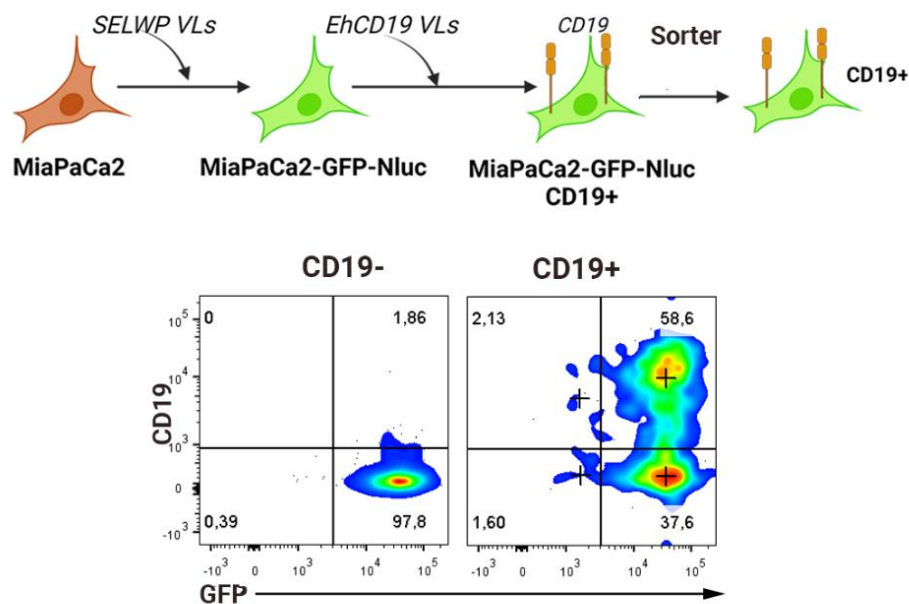


Figura 15. Generación de un modelo artificial CD19+ de tumor pancreático. Arriba: Las células MiaPaCa2 fueron transducidas secuencialmente con los vectores SELWP y EhCD19 para que expresaran GFP-Nluc y CD19 humana, respectivamente. Abajo: Dot-plots de la expresión de GFP/CD19 de las líneas CD19- y CD19+ tras dos semanas post-sorter.

RESULTADOS: PARTE III

GENERACIÓN DE CÉLULAS ANTICD19-CAR-T CON UNA EXPRESIÓN FISIOLÓGICA

Uno de los principales problemas de la terapia CAR-T actual, es la sobreactivación de la célula CAR-T que no sólo conlleva a una falta de eficacia en la terapia debido al agotamiento precoz de las células T, sino también a un exceso de citoquinas proinflamatorias que acaban desencadenando una tormenta de citoquinas y efectos secundarios neurológicos, que, si no son controlados, puede provocar daños irreversibles en el paciente e incluso la muerte.

Una alta expresión y constitutiva del CAR provoca una agregación o *clustering* del CAR en la superficie, la cual permite una secreción mayor de citoquinas de manera muy rápida tras el reconocimiento del antígeno tumoral (mayor diferenciación, más AICD y agotamiento). Por otro lado, una señalización tónica en ausencia de antígeno, lo cual no sólo agota prematuramente a la célula T, si no que puede contribuir a la producción de citoquinas de manera no específica.

Por ello, cada vez más trabajos (Eyquem *et al.*, 2017; Gomes-Silva *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2021b) sostienen la importancia de regular dicha expresión en la superficie de la célula CAR-

T con la intención de optimizar su actividad terapéutica. En 2017, el grupo de Sadelain generó células α CD19-28 ζ -T utilizando CRISPR/Cas9, donde el CAR se regulaba bajo el promotor endógeno de la cadena constante alfa del receptor de la célula T (TRAC) y se incrementaban sus propiedades antitumorales con mejor agotamiento y menor diferenciación. Esta expresión no era constante, sino que había una bajada de la dicha expresión tras el encuentro con el antígeno, que se recuperaba entre 1-3 días después y que era crítico para incrementar su potencia. Sin embargo, a pesar del increíble potencial de las herramientas de edición genómica y su emergente presencia en la clínica, aún hay que resolver algunas cuestiones técnicas y de seguridad para que sean aprobados como ATMP. Por ello, nos planteamos adaptar la hipótesis de que la expresión del CAR mimetice el patrón del TCR en una situación fisiológica dentro de un contexto de vector lentiviral.

3.1 ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL TCR/CD3

En primer lugar, estudiamos el patrón del TCR/CD3 a través de la expresión de CD3 en superficie y por RNA mensajero tras la estimulación vía TCR/Cd28 con una nanomatrix anti-CD3/CD28 (TransAct) con la intención de mimetizar una presentación antigénica artificial de la primera y segunda señal de activación (**Figura 16A**). De esta manera, tras la estimulación a tiempo cero, corroboramos cómo se producía una bajada de CD3 tras la estimulación como se ha descrito previamente (Eyquem *et al.*, 2017), con una mínima expresión a las 24h que se restaura a niveles basales a las 72-96h tanto a nivel de proteína y a las 48h de nivel mRNA mensajero (**Figura 16B**).

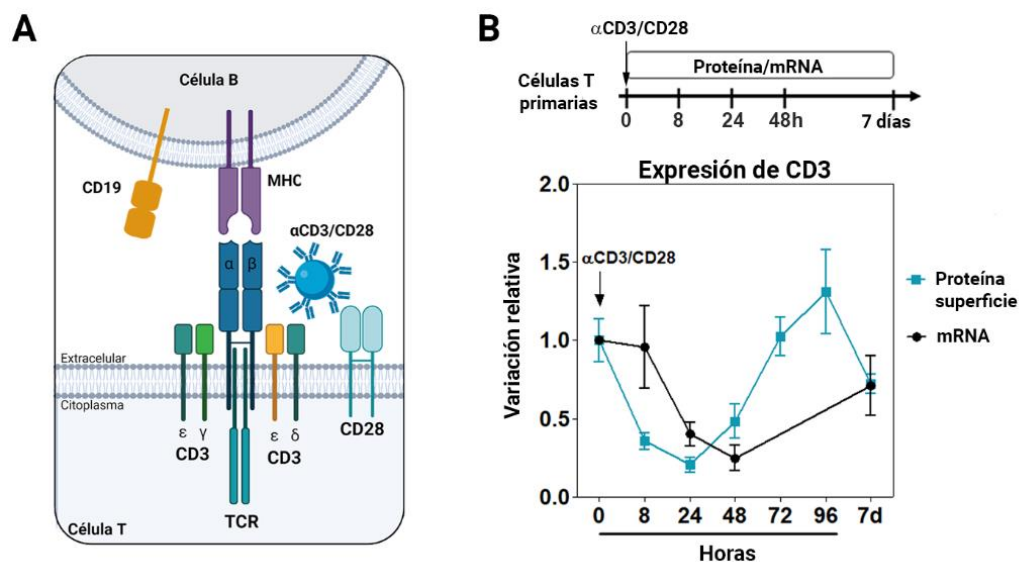


Figura 16. Estimulación con matriz α CD3/CD28 para mimetizar una presentación antigénica artificial vía TCR. A) Esquema representativo de la interacción TCR/ MHC de una célula B, así como la estimulación artificial con anti-CD3/CD28 en la célula T. B) Variación relativa de la expresión de CD3 en

células T primarias respecto a 0h determinada por proteína en superficie (FACS, azul) o por mRNA (negro) a diferentes tiempos post-activación con α CD3/CD28. $n \geq 5$.

3.2 COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES PROMOTORES EN EL CONTEXTO DE VL EXPRESANDO GFP

A continuación, ya que los VLs constituyen una herramienta aprobada para el desarrollo de medicamentos de terapias avanzadas, utilizar VLs para expresar el CAR con una cinética que mimetice el patrón fisiológico del TCR puede ser una buena alternativa para generar células CAR-T más potentes y seguras. En primer lugar, queríamos comparar el patrón de expresión de varios promotores entre ellos, promotores quiméricos basados en el locus del síndrome de Wiskott-Aldrich (locus WAS), desarrollados por el grupo, para ver si estos últimos podían generar una expresión más fisiológica comparado con aquellos promotores que se están usando actualmente en los CAR-T comerciales (el promotor viral MSCV o EF1 α).

De este modo, generamos partículas virales de dos promotores basados en WAS (WE, AWE) y tres promotores de expresión fuerte basados en el virus del CMV, SSFV y en el promotor humano EF1 α (**Figura 17A**) y generamos células T que van a expresar eGFP bajo estos promotores.

Tras dejar las células en reposo durante 10 días tras la activación inicial necesaria para la transducción con los VLs, las estimulamos de nuevo con la nanomatriz α CD3/CD28 y analizamos los niveles de eGFP a diferentes tiempos (**Figura 17B**). De este modo, observamos que, todos los vectores que albergaban promotores constitutivos fuertes como CMV-CEWP, SSFV-SE y EF1 α -EFEWP, generaron un incremento de la expresión de eGFP tras la activación (**Figuras 17C, 17D**), comportándose justo al contrario que la expresión fisiológica de CD3. Por otro lado, Los VLs WE y AWE, mimetizaron parcialmente esa bajada en la intensidad de expresión tras la estimulación, alcanzando su mínimo a las 72h y recuperando los niveles basales a día 7 (**Figuras 17C, 17E** verde, azul).

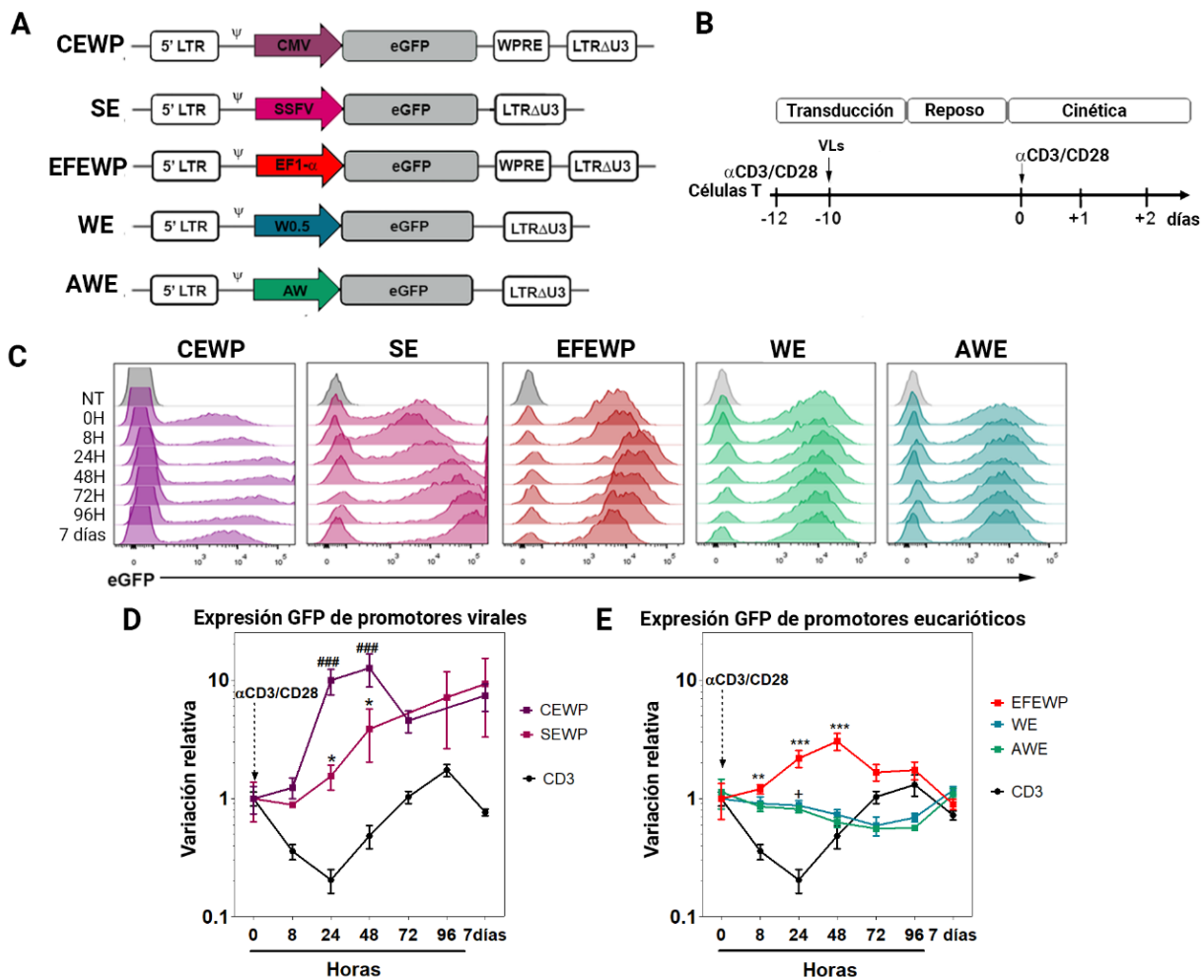


Figura 17. Las células T transducidas con VLs que incluyen el promotor WAS imitan parcialmente el patrón de expresión de TCR. A) Diseño experimental para estudiar el patrón de expresión de eGFP después de la estimulación con TCR. B) Diagramas de los diferentes VLs que expresan eGFP bajo los promotores CMV, SFFV, EF1a, W0.5 y AW. C) Histogramas representativos de la expresión de eGFP controlada por VLs con promotores fuertes (CEWP, SE y EFEWP) y por promotores WAS (WE, AWE) a diferentes momentos tiempos post-estimulación. D, E) Gráficos que la variación relativa de la expresión de eGFP (líneas de color) vs CD3 (líneas negras) a lo largo del tiempo después de la estimulación de α CD3/CD28 de células T transducidas con promotores virales (CEWP, SEWP) (D) o eucarióticos (EFEWP, WE y AWE) VLs (E). La variación relativa se calcula mediante la siguiente fórmula: $((\text{MeFI de la población de GFP} + xh / \text{MeFI de células no transducidas } xh) / \text{MeFI de la población de GFP} + 0h / \text{MeFI de células no transducidas } 0h)$. ANOVA, post test de Bonferroni, comparado con el patrón CD3: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. En el caso de +++ indica $p < 0,001$ para SEWP en comparación con la expresión de CD3. $n=5$.

3.3 EL PROMOTOR WAS COMO CANDIDATO PARA TERAPIA CON CÉLULAS CAR-T

En base a los resultados obtenidos con los vectores eGFP, los VLs WE y AWE eran candidatos potenciales a ser utilizados para la terapia con células CAR-T, dado que su patrón de expresión no se incrementaba como ocurría con los promotores fuertes e incluso se observaba una pequeña bajada en la expresión tras la estimulación.

El gen WAS, cuya expresión está restringida al linaje hematopoyético, codifica para la proteína WASP (del inglés, *Wiskott-Aldrich Protein*), la cual está implicada en la nucleación de la actina, y responde tras la activación de la célula T para contribuir a los procesos de migración y sinapsis inmunológica, entre otros. La expresión de dicha proteína está controlada por un promotor proximal de 1.6kb (**Figura 18A**, rojo) adyacente al sitio de transcripción (TSS) y un promotor alternativo 6kb aguas arriba (azul). Nuestro grupo ha diseñado varios promotores quiméricos basados en este gen, que incluyen el promotor proximal 0.5kb (W0.5kb, rosa) y el promotor AW, una conjunción de un fragmento del promotor alternativo (el promotor de 0.38kb, verde) junto con el promotor proximal mínimo W0.5, para su uso en terapia génica del síndrome de Wiskott Aldrich (Martín *et al.*, 2005; Frecha *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2020).

Decidimos comparar a continuación, los potenciales sitios de unión de factores de transcripción presentes en la secuencia del promotor EF1 α , utilizado en la gran mayoría de los CARs clínicos (incluyendo los productos Kymriah, Breyanzi y ARI-0001) versus los presentes en el promotor AW, utilizando dos herramientas bioinformáticas de predicción de estos sitios de unión de factores de transcripción: PROMO y Alibaba2, los cuales usan la base de datos TRANSFAC (**Figura 18B**). Los análisis de las secuencias de ambos promotores predijeron la presencia común de 10 sitios, mientras que EF1 α tenía otros 9 sitios no compartidos y AW, 5. El promotor EF1 α presenta más sitios de unión de factores relacionados con la activación de las células T como son con la respuesta a interferón (IRF-2 y ISGF-3) aunque AW, tiene sitios como Elk1 o STAT-4 que podrían hacerle responder a citoquinas y estrés. Llama la atención la presencia de un sitio FOXP3 en el promotor AW, que, aunque es típico de células T reguladoras, podría ser un elemento diferenciador importante entre ambos promotores.

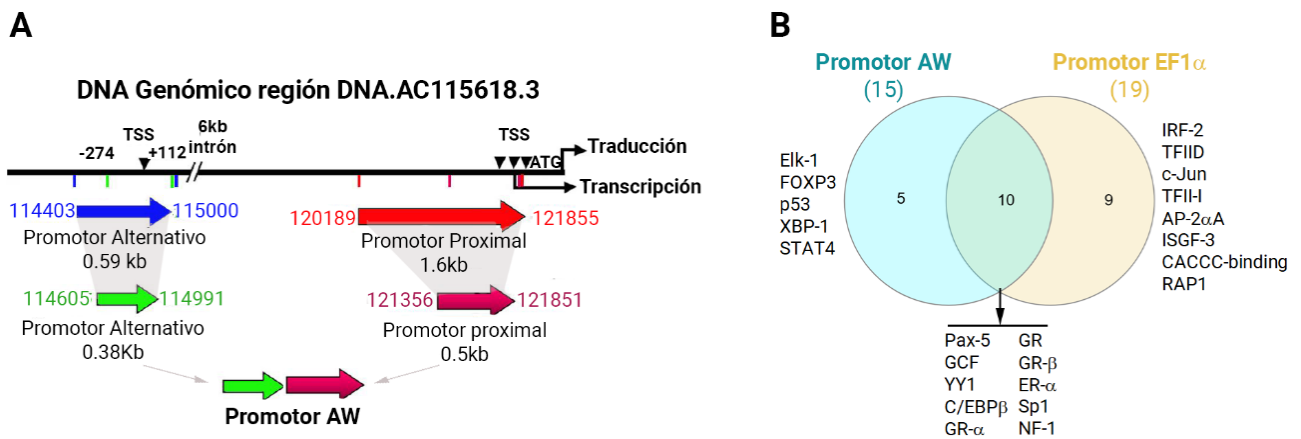


Figura 18. Características del promotor AW. A) Composición del promotor quimérico AW basado en el locus WAS. Los promotores completos alternativo (azul) y proximal (rojo), fueron reducidos a sus promotores mínimos de 0.38kb (verde) y 0.5kb (rosa) (Martin *et al.* 2005, Frecha *et al.* 2008) y juntados en un contexto de vector lentiviral para general el promotor AW. B) Diagrama de Venn de los factores de transcripción hipotéticos dado por las herramientas bioinformáticas PROMO2 y Alibaba2 que comparten los promotores EF1 α , WAS y algunos seleccionados como relevantes en células T.

3.4 LA EXPRESIÓN DEL CAR EN CÉLULAS T BAJO EL PROMOTOR AW MIMETIZA EL PATRÓN DEL CD3/TCR

A continuación, investigamos si los CAR bajo el promotor WAS también seguían una cinética similar al TCR. Construimos el AWARI-VL (ver M&M), sustituyendo el promotor EF1 α del vector lentiviral ARI-0001, un CAR19-BBzz (con los dominios intracelulares 41BB y CD3z) recientemente aprobado como ATMP en España, que usa el clon A1B6 como scFv (**Figura 19A**).

Tras generar células ARI y AWARI-CAR-T, queríamos ver si el patrón de CD3 tras la estimulación de las células transducidas se veía afectado por expresar el CAR. Así, encontramos que cuando las células eran activadas vía TCR/CD28 o vía CAR, se continuaba produciendo esa bajada de la expresión de CD3 a 24h en la superficie de la célula (**Figuras 19B, 19C**), siendo significativamente mayor, cuando utilizamos la nanomatriz aCD3/CD28 (**Figura 19B**).

Seguidamente, estudiamos la cinética de expresión del CAR en superficie tras la activación de células CAR-T ARI y AWARI con células CD19+ (**Figuras 19D, 19E**, izquierda) y vía TCR/CD28 (**Figura 19E**, derecha) utilizando las mismas condiciones descritas previamente. Tal y como esperábamos, las células AWARI CAR-T (líneas azules) mostraron una regulación a la baja de los niveles de CAR después de la estimulación antigénica con los dos tipos de estímulo y una recuperación después de 48h, muy similar al patrón fisiológico del TCR/CD3 (en negro). Por el contrario, las células ARI CAR-T mostraron un claro incremento en los niveles de CAR después de la activación de las células T (**Figura 19D, 19E**).

Así, nuestros resultados demuestran que los AW-LV se pueden usar para generar células CAR-T para expresar el CAR de una manera similar al patrón fisiológico del TCR.

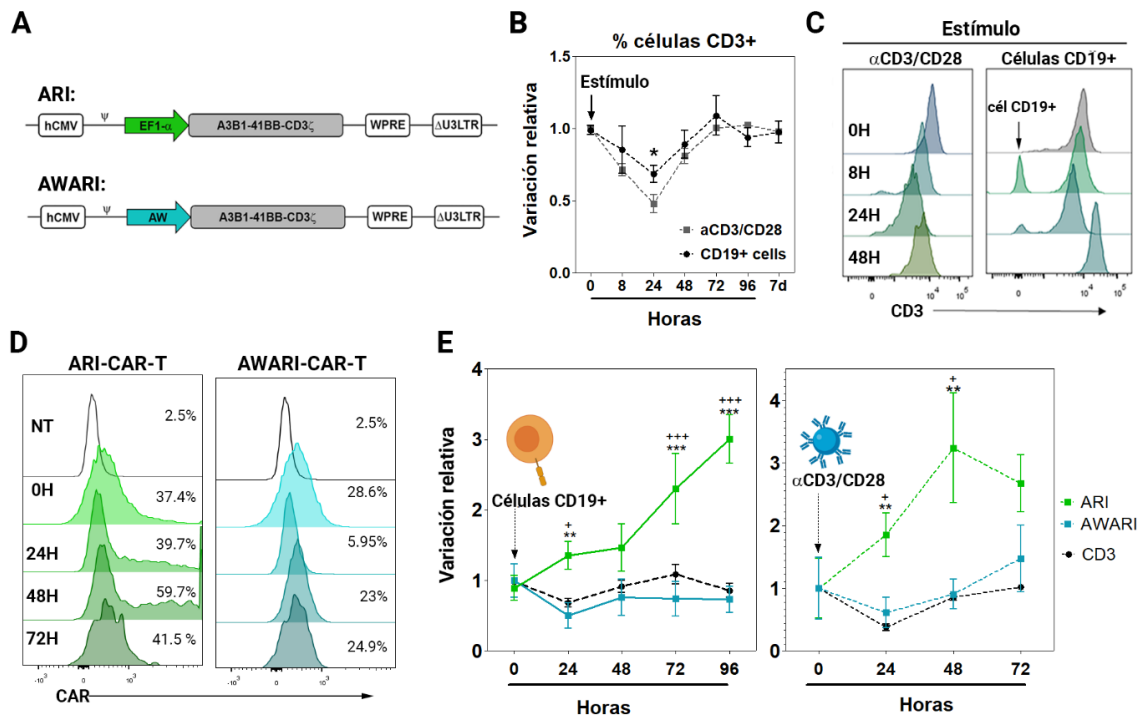


Figura 19. Comparativa de los niveles de CAR dados por el control de los promotores EF1 α y AW. A) Diagramas de VLs que utilizan el promotor EF1 α (ARI) y por el promotor WAS (AWARI) para expresar el CAR ARI-0001 (α CD19-A3B1-41BB-CD3 ζ). B) Comparativa de la variación de la expresión de CD3/TCR determinada por citometría de flujo de células CAR-T estimuladas vía TCR (α D3/CD28) y vía CAR (con células CD19+) a largo del tiempo. *, indica p<0.05, 2 vías-ANOVA, Bonferroni post-Test. n \geq 5. C) Histogramas representativos de la expresión de CD3 en la primeras 48h post-estimulación con α CD3/CD28 y células B CD19+. D) Histogramas representativos de los niveles de expresión de CAR en células no transducidas (NT, histogramas en gris) y en CAR-T generadas con los VL-ARI (izquierda, verde) o AWARI (azul, derecha) en reposo (0h) y a diferentes tiempos (24, 48, 72h) después de la activación con células CD19+. E) Gráficos de la variación relativa de la expresión del CAR en células ARI-CAR-T (líneas verdes) y AWARI-CAR-T (líneas azules) vs la expresión de CD3 (línea negra) a diferentes horas tras activación vía CAR (con células CD19+, izquierda) o vía TCR/CD28 (con la nanomatriz α CD3/CD28). Los datos muestran el porcentaje de células CAR+ en diferentes puntos de tiempo en relación con 0 horas. Prueba de Man-Whitney, dos colas, ** indica p <0.01 respecto el patrón de CD3 y +, indica p <0,05 comparado con las células AWARI-CAR-T (n \geq 5).

3.5 LAS CÉLULAS AWARI-CAR-T TIENEN MENOS SEÑALIZACIÓN TÓNICA Y MENOR AGOTAMIENTO A NIVEL BASAL

A continuación, comparamos el comportamiento de las células ARI-CAR-T frente a las

células AWARI CAR-T en cultivo, diez días después de la activación inicial (**Figura 20A**). En todos los casos se compararon células ARI y AWARI con porcentajes similares de transducción (20-30% CAR+) aunque para ello, las células AWARI presentaban casi ~2 veces más de número de copias del vector por célula (2.46 ± 0.78 copias/célula vs 4.68 ± 1.25 c/c para ARI y AWARI respectivamente). Primero, medimos los niveles basales de los marcadores de agotamiento (LAG-3, PD1, Tim3) (**Figura 20B**) y la señalización tónica (fosfo-CD3z) (**Figura 20C**) en un contexto independiente de CD19. Las células AWARI CAR-T expresaron niveles significativamente más bajos de LAG-3 y Tim3 (y una tendencia a la baja de Tim3) (**Figura 20B**, abajo) y menor fosforilación de CD3z (**Figura 20C**).

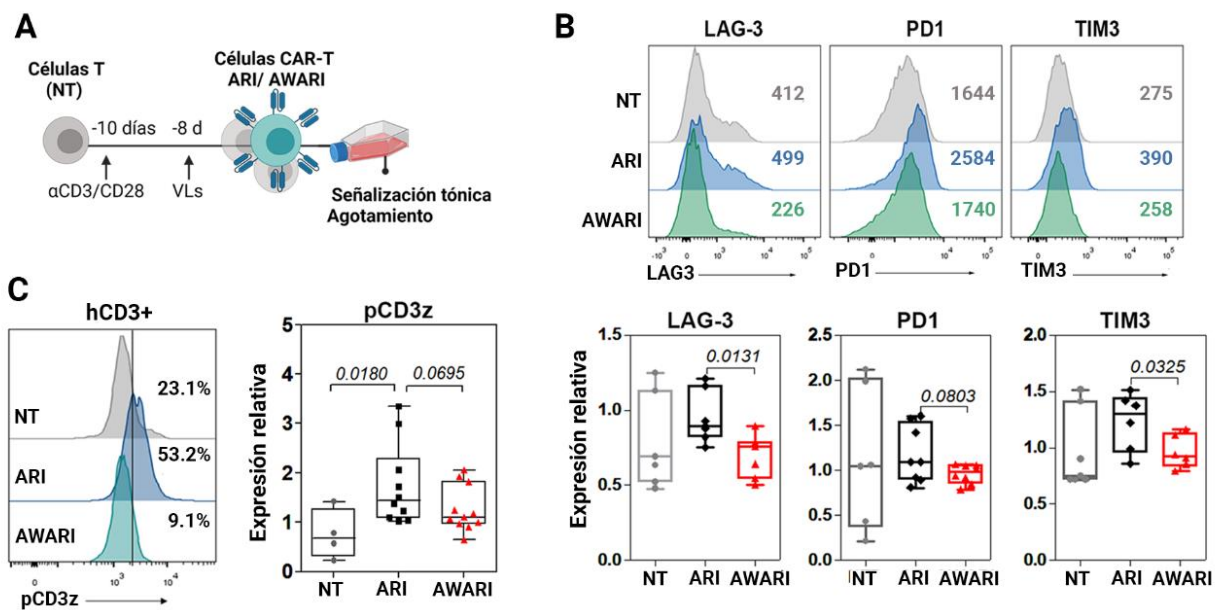


Figura 20. Señalización tónica y agotamiento basal en ausencia de estimulación antigénica. A) Cronograma experimental para la determinación de la señalización tónica y niveles basales de agotamiento a los 10 días de la activación inicial. B) Arriba: Histogramas representativos de la expresión de LAG-3, PD1 y Tim3 de células NT (no transducidas, gris), CAR-T ARI (azul) y AWARI (verde). Abajo: Representación gráfica de los niveles de expresión de LAG-3, PD1 y Tim3 de células ARI y AWARI CAR-T relativo al valor de sus células NT para cada donante. Los datos son MeFI±SEM. Prueba de Man-Whitney de una cola (4 donantes independientes). B) Izquierda: Histogramas representativos de la expresión intracelular de fosfo-CD3z de células NT (gris), y células CAR-T ARI (azul) y AWARI (verde). Derecha: Gráfico de los niveles de expresión de pCD3z de células ARI y AWARI CAR-T relativa a sus células NT para cada donante. Los datos representados son la proporción del MeFI de pCD3z de las células ARI o AWARI CAR-T dividida por MeFI el pCD3z de células NT. Prueba de Man-Whitney de una cola (4 donantes independientes, $n \geq 4$).

3.6 EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL CAR SIMILAR AL TCR PREVIENE EL AGOTAMIENTO Y CONTROLA LA SECRECIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS TRAS LA EXPOSICIÓN AL ANTÍGENO *IN VITRO*

En segundo lugar, nos planteamos estudiar su capacidad citotóxica *in vitro* (**Figura 21A**), en dos modelos de células CD19+: Nalm6, de LLA y Namalwa, derivada de un linfoma de Burkitt, las cuales hemos modificado para que expresen altos niveles de GFP-Nluc+.

A continuación, analizamos la secreción de dos citoquinas proinflamatorias, TNF α e IFN γ a las 24h en presencia de las células CD19+ Namalwa, y detectamos que las células AWARI CAR-T secretaron niveles más bajos de ambas citoquinas en comparación con las células ARI (**Figura 21B**), lo que indica una actividad proinflamatoria más controlada.

La citotoxicidad fue evaluada mediante citometría de flujo, marcando las células T con anti-CD3 y determinando la pérdida de la población GFP+ correspondiente a las células tumorales, mientras que las células control CD19- HL-60 se mantuvieron sin marcar. Brevemente, cultivamos células Nalm6 o Namalwa GFP+, junto con HL-60 en varias proporciones con células T (No transducidas NT, ARI y AWARI, las cuales expresan porcentajes similares de CAR+) en medio TexMACs sin citoquinas (**Figura 21A**). A las 48h, tomamos las muestras para su análisis, considerando la máxima presencia tumoral CD19+ en el co-cultivo con células T no-transducidas (21% de células Namalwa y 28.7% de células CD19- HL-60) (**Figura 21C**). Así, observamos cómo ambas células CAR-T destruyeron eficazmente CD19+ Nalm6 y Namalwa en cultivo, sin encontrar ninguna diferencia significativa (**Figura 21D**). Este tipo de análisis nos permite una mejor caracterización de las células CAR-T tras el encuentro tumoral, estudiando marcadores de agotamiento y fenotipo (**Figura 22**).

Curiosamente, los niveles de expresión de LAG-3 fueron significativamente más bajos en AWARI en comparación con las células ARI CAR-T tras la lisis de células Namalwa (**Figura 22A**, derecha). Sin embargo, no hubo diferencias en la expresión de Tim3 ni PD1 tras la lisis (**Figura 22B**). Por otro lado, analizamos el fenotipo de las células CAR-T tras 48h en estos mismos experimentos de citotoxicidad (**Figura 22C, D**) y observamos una tendencia a que las células presentaran un fenotipo menos diferenciado comparado con ARI en cuatro donantes independientes. Con el objetivo de poder comparar los fenotipos tan variables de los diferentes donantes, decidimos normalizar los porcentajes de células T_{SCM}, T_{CM} y T_{EF} respecto a su porcentaje de células T_{EM} (CD45RA-CD62L) (**Figura 22D**). Así, observamos una tendencia a que las células AWARI exhibieran una mayor proporción de TSCM y TCM que sus células ARI

homólogas, aunque no estadísticamente significativa (**Figura 22D**).

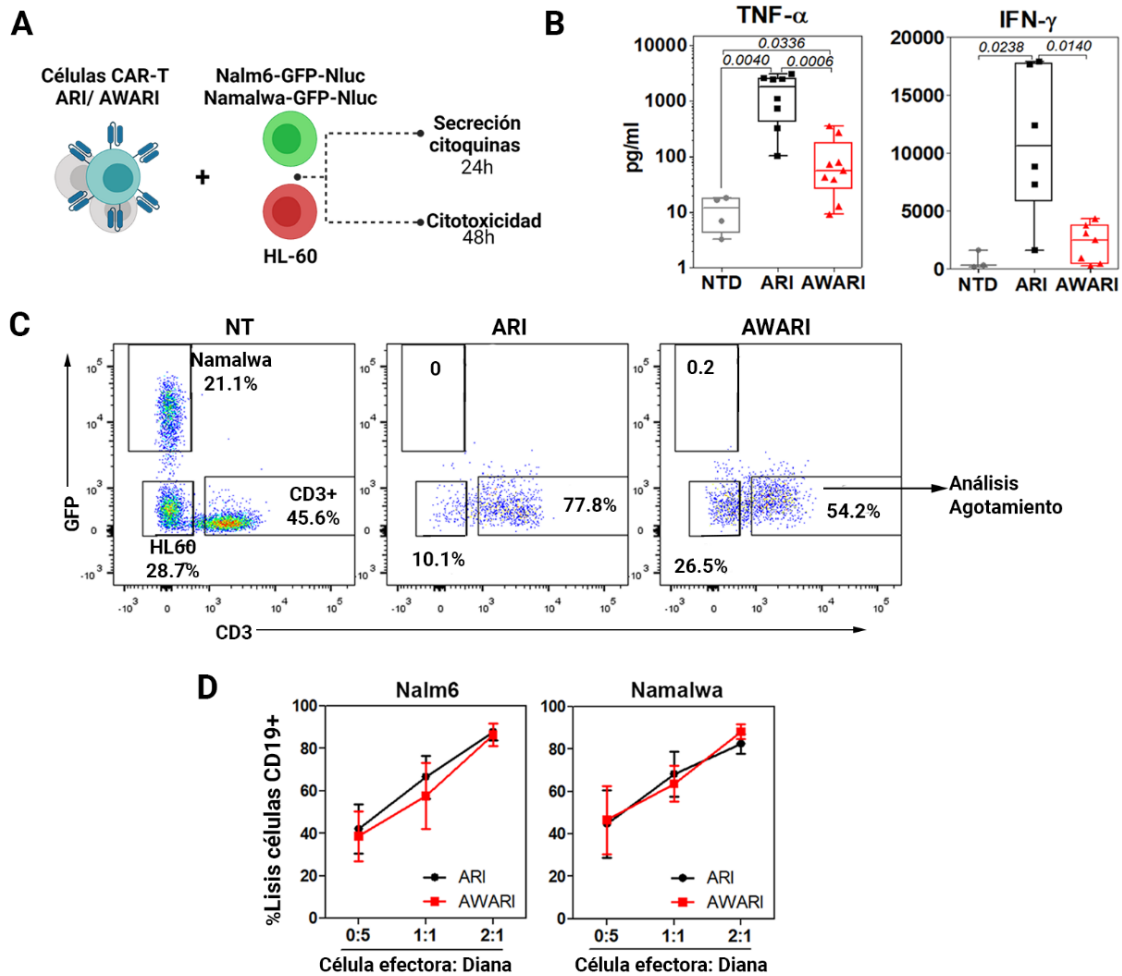


Figura 21. Las células AWARI-CAR-T demuestran la misma eficacia antitumoral *in vitro* frente a tumores CD19+ que ARI con una menor secreción de citoquinas proinflamatorias. A) Diagrama experimental del co-cultivo de las células NT (no transducidas), ARI y AWARI con células diana CD19+ Nalm6 o Namalwa-GFP-Nluc y células CD19- (HL-60) para la determinación de citoquinas secretadas a las 24h y citotoxicidad a las 48h. B) Niveles de TNF α (izquierda) e IFN γ (derecha) secretados producidos por células NTD, ARI y AWARI CAR-T después de 24 h de estimulación con Namalwa en proporción 1: 1 y determinados por ELISA (T-Test de Man-Whitney, 4 donantes independientes, n \geq 4). C) Dot-plots indicativos de los ensayos de citotoxicidad con ratio célula T: célula diana 2:1. D) Porcentaje de lisis de células CD19+ (Nalm6 y Namalwa) a diferentes ratios de co-cultivo con células ARI y AWARI-CAR-T

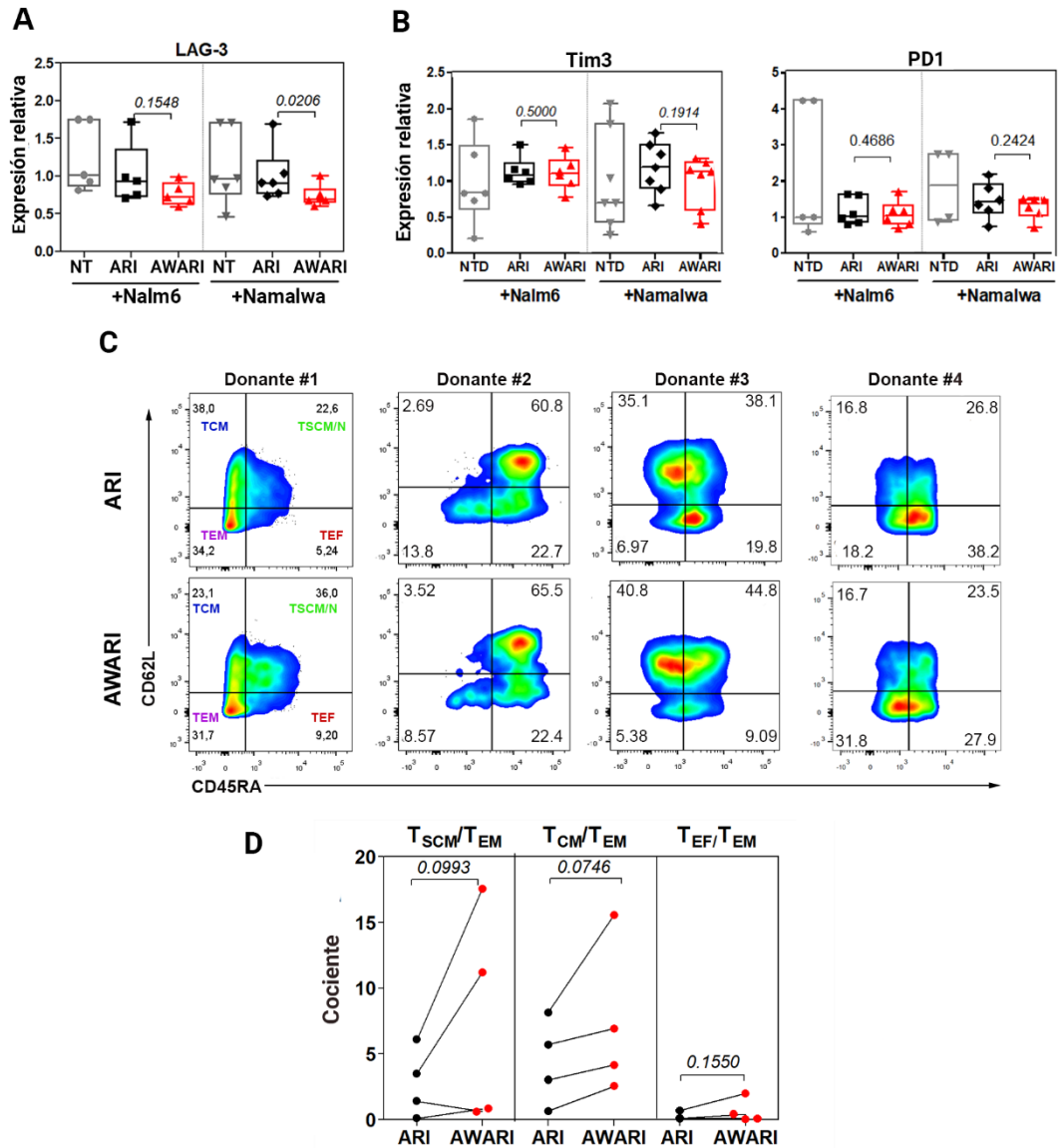


Figura 22. Análisis de marcadores de agotamiento y fenotipo tras la lisis de células CD19+. A) Expresión relativa de LAG-3 y B) niveles de Tim3 y PD1 en células ARI y AWARI CAR-T respecto a las células NT, tras 48 h en co-cultivo con células Nalm6 (izquierda) o Namalwa (derecha). Los datos representan el MeFI de LAG-3 de células ARI o AWARI dividido entre el MeFI LAG-3 MeFI de células NT. Prueba de Man-Whitney de una cola ($n \geq 5$). C) Dot-Plots de CD45RA /CD62L de células ARI y AWARI CAR-T de cuatro donantes independientes después de 48h en cultivo con células de Namalwa en una proporción de 1: 1. D) Representación gráfica de la proporción de células TSCM/TEM, TCM/TEM y TE/TEM para cada transducción independiente. Test de datos pareados entre ARI y AWARI, una cola ($n=4$).

3.7 LAS CÉLULAS AWARI-CAR-T SON MÁS EFICACES EN UN MODELO DE TUMOR PANCRÉATICO CD19+

Recientemente, hemos desarrollado un modelo artificial *in vitro* derivado de una línea tumoral pancreática con la intención de comparar ambas células ARI y AWARI en un ambiente más hostil e inmunosupresor, donde se necesita una mayor persistencia. Con este modelo nos planteamos realizar los experimentos de citotoxicidad donde enfrentamos una población de células NT, ARI y AWARI con porcentajes de transducción similares (20-30% CAR+) en un ratio de 2.5 células por cada célula MiaPaCa2 GFP+ CD19-, GFP+ CD19+ (**Figura 23A**).

Cada 48h tomamos una muestra y volvimos a enfrentar las células T supervivientes a nuevas células tumorales MiaPaCa2 hasta un total de 3 encuentros. Las células AWARI-CAR-T, resultaron ser igual de potentes en el primer encuentro comparadas con ARI, pero se mantuvieron significativamente más citotóxicas tras el tercer encuentro, indicando una mayor persistencia funcional. Este resultado va en la línea de que las células AWARI son más eficaces a largo plazo en un entorno hostil tras diferentes desafíos (**Figuras 23B, C**), con una población mayoritariamente efectora memoria en comparación con las células ARI (**Figura 23D**). Es interesante destacar que las células tumorales GFP+ fueron prácticamente eliminadas en su totalidad, a pesar de ser una población heterogénea para la expresión de CD19+, como habíamos visto previamente en la generación del modelo (**Figura 15**).

Por otro lado, en un estudio preliminar para comparar si los niveles de CAR dados por los dos vectores y las diferencias en la señalización tónica observadas podían generar AICD, estudiamos los niveles de Fas en la superficie de las células T (**Figura 23E**). Fas (CD95) es una proteína transmembrana que contiene un dominio de muerte (DD, *death domain*) en su región citoplásmica, esencial para iniciar la apoptosis tras su activación con FasL. Fas se expresa ubicuamente en las células T activadas, por lo que sugiere otra manera de corroborar los efectos de una posible señalización continua por CAR. De este modo, determinamos los niveles de Fas en células T primarias NT, ARI y AWARI tanto basalmente como 72h tras haber estado en cocultivo con células Namalwa y MiaPaCa2-CD19+. Así, las células AWARI sin estimulación antigénica, expresaban niveles de Fas significativamente más bajos comparados con ARI (**Figura 23E, izquierda**). Tras la estimulación con las células CD19+, se observó un incremento de los niveles de FAS en todos los casos (**Figura 23E, centro y derecha**). Sin embargo, la incubación con células Namalwa produjo un incremento de Fas mayor en células NT, ARI y AWARI, en general, que los incrementos observados con la incubación con MiaPaCa2-CD19+. Además, en este último escenario, volvíamos a ver una tendencia donde los niveles de FAS volvíamos a ser menores en AWARI que en ARI (**Figura 23E, barras de la derecha**).

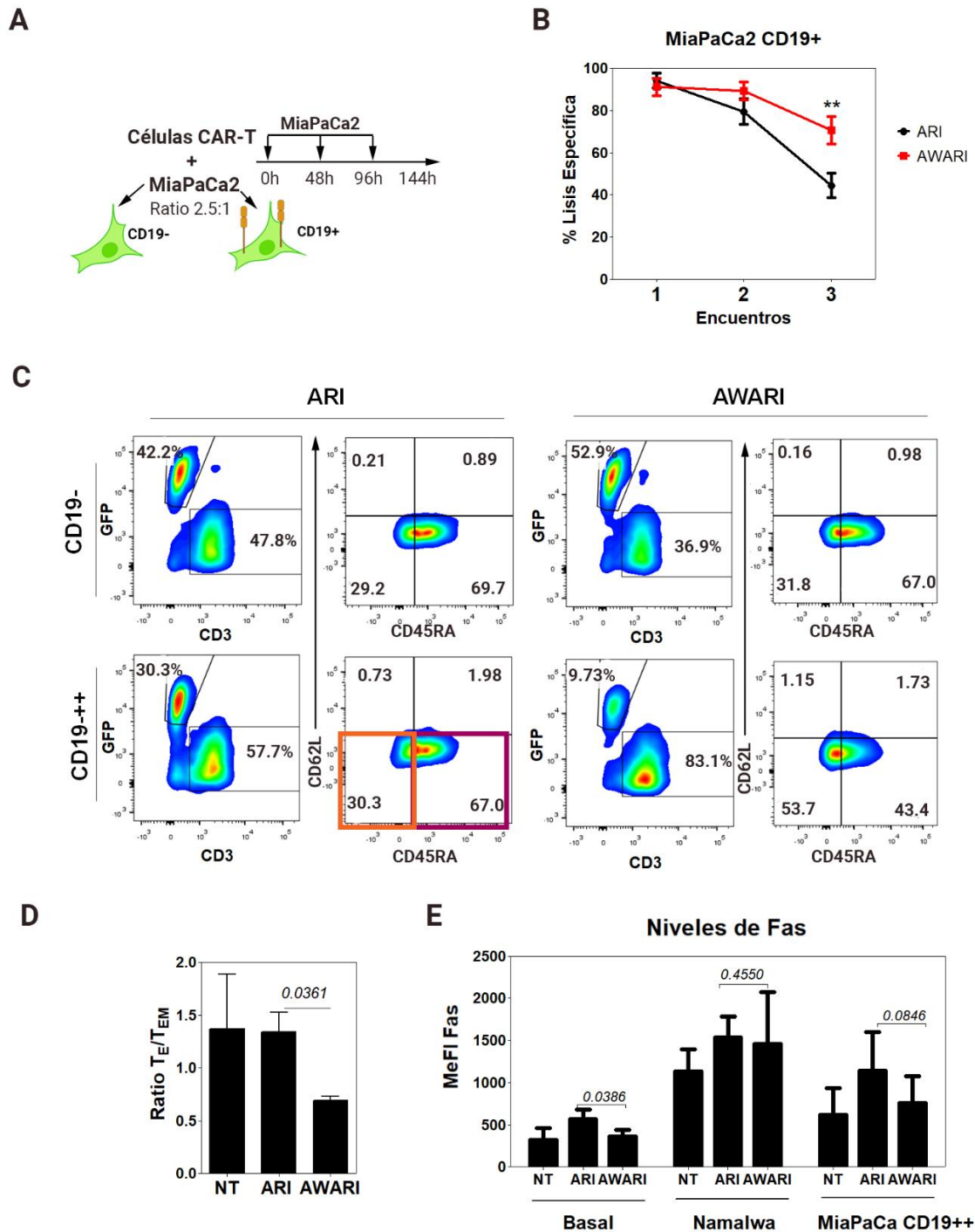


Figura 23. Caracterización de la actividad lítica y fenotipo células ARI y AWARI en un modelo artificial CD19+ de tumor pancreático *in vitro*. A) Arriba: Diagrama de la generación del modelo GFP+CD19+ con células MiaPaCa2. Abajo: Dot-Plots de las poblaciones GFP+CD19+ de las células MiaPaCa2 generadas: CD19- y CD19+. B) Arriba: representación de los ensayos de citotoxicidad con las células MiaPaCa2, exponiendo a las células CAR-T a un nuevo encuentro con células tumorales cada 48h hasta un total de 3 (n=3) Test ANOVA, dos colas **, p<0.01. C) Dot-Plots representativos del tercer encuentro de células ARI y AWARI con células MiaPaCa2 GFP+ CD19- y CD19++ para determinar la citotoxicidad como pérdida de fluorescencia GFP y el fenotipo de las células T CD3+ en base a

CD45RA/CD62L. Se señalan dos cuadrados, naranja y rosa, correspondientes a las poblaciones TEM (CD45RA- CD62L-) y TE (CD45RA+CD62L-), respectivamente. D) Ratio de los porcentajes de TE/TEM, calculadas como el porcentaje del cuadrado rosa (TEF) entre el cuadrado naranja (TEM). T-test pareado (n=3). E) Expresión de Fas (mediana de intensidad de fluorescencia MeFI) para las células NT (no-transducidas), ARI y AWARI en condiciones basales y a las 72h tras su estimulación con células Namalwa y MiaPaCa2 en proporción 1:1.

RESULTADOS: PARTE IV

ENSAYOS PRECLÍNICOS DE FUNCIONALIDAD *IN VIVO* DE LAS NUEVAS CÉLULAS CAR-T FISIOLÓGICAS Y SU ESCALABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN CLÍNICA

4.1 LAS CÉLULAS AWARI-CAR-T SON IGUAL DE EFICIENTES ERRADICANDO CÉLULAS DE LINFOMA *IN VIVO* QUE LAS CÉLULAS ARI-CAR-T PERO MANTENIENDO UN FENOTIPO MENOS DIFERENCIADO

Los experimentos de citotoxicidad *in vitro* solo representan la actividad de las células CAR-T a corto plazo. Por lo tanto, realizamos una comparación directa de la actividad antitumoral de las células ARI frente a las células AWARI CAR-T en un modelo de linfoma humano en ratones NSG, con la intención de estudiar su comportamiento en un entorno donde la terapia CAR-T ha tenido menos éxito en comparación a los modelos de LLA, ya que por la naturaleza tumoral de linfoma infiltra primero órganos linfoides secundarios, con un TME asociado.

Utilizamos dos dosis de células T con porcentajes de células CAR-T diferentes. Realizamos un primer ensayo, inoculando 5 millones de células T con un 20-30% de CAR+ (ARI y AWARI, con 4.4 y 3.5 copias por célula integradas, respectivamente) (representados con los puntos color violeta) que duró hasta 15 días tras el inicio del experimento. En el segundo ensayo, utilizamos 10 millones de células transducidas con un 10-15% de CAR+, (puntos azules) con 3.5 y 5.8 copias por célula (c/c) para células ARI y AWARI, respectivamente. En este caso, enfrentamos a las células CAR-T a un segundo desafío, volviendo a inocular células Namalwa en un grupo de ratones a los 13 días, con la intención de mimetizar una posible recidiva (**Figura 24A**). En este caso, el experimento fue prolongado hasta 28 días y realizamos dos controles semanales de bioluminiscencia (**Figura 24B**). En general, se inocularon $1-1.5 \times 10^6$ células CAR+/ 10^6

ratón en todos los casos, con una media de 4.1 ± 0.3 c/c de vector ARI y 4.7 ± 1.6 c/c de vector AWARI.

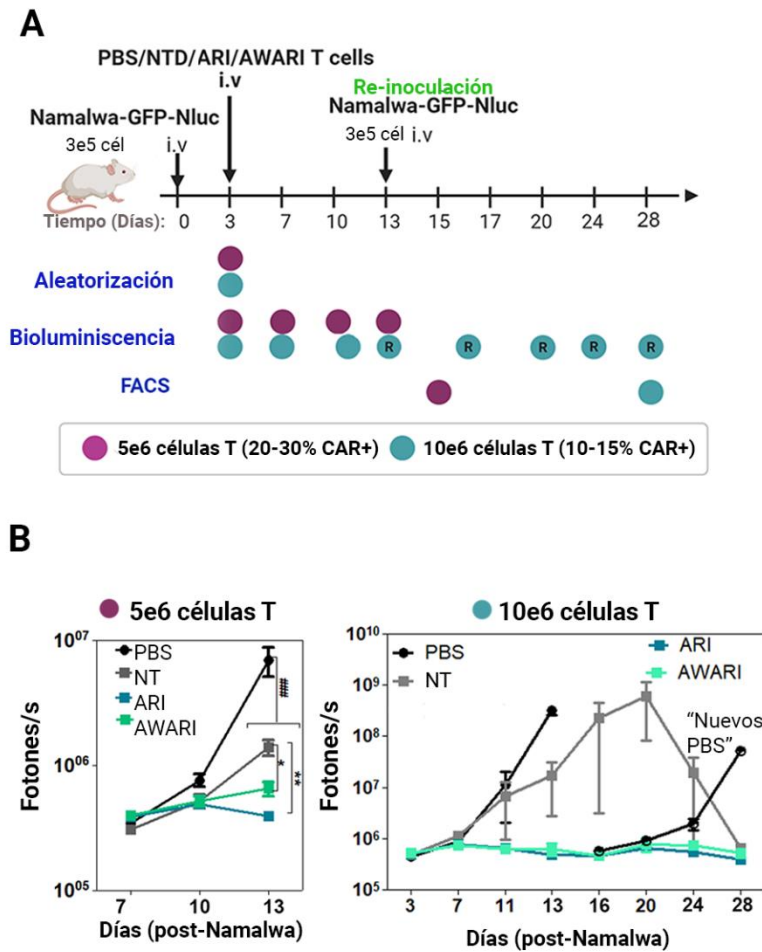


Figura 24. Eficacia terapéutica *in vivo* de las células ARI y AWARI-CAR-T en un modelo de linfoma de Burkitt. A) Diseño experimental de la actividad antitumoral *in vivo* y análisis fenotípicos de las células CAR-T inoculadas en los ratones NSGs los cuales habían sido previamente inoculados con células Namalwa GFP+Nluc+ derivadas de linfoma de Burkitt. Se realizaron dos experimentos *in vivo*: uno (puntos morados), inoculando 5e6 de células ARI y AWARI CAR-T, con un 20-30% de células CAR+ y con 4.4 y 3.5 copias/célula de ARI y AWARI, respectivamente; y un segundo experimento, inoculando dosis de células CAR-T de 10e6 (puntos azules), expresando un 10-15% de células CAR+ y con 3.5 y 5.8 copias de vector integrado ARI y AWARI, respectivamente. El nuevo desafío/inoculación/reexposición con células Namalwa se indica con una flecha en el día 16 en experimento con la dosis de 10e6. El análisis fenotípico se realizó después del sacrificio el día 13 para la dosis de 5e6 y el día 28 para la dosis de 10e6. B) Progresión de la bioluminiscencia tumoral (BLI) con dosis de células T 5e6 (izquierda) y 10e6 (derecha) en diferentes días después de la inoculación de Namalwa. Los diferentes grupos terapéuticos se indican con colores como ratones inoculados con PBS (negro), células NT (gris), células CAR-T ARI (azul) y AWARI (verde).

A día 13 en el experimento de dosis alta, observamos que todos los ratones ARI y AWARI estaban libres de presencia tumoral, mientras que los ratones que no fueron inoculados con

ninguna célula T, “PBS”, tuvieron que ser sacrificados. Ambas células CAR-T eliminaron eficazmente las células tumorales de Namalwa en ratones tratados con ambas dosis (**Figuras 24B, 25**). Curiosamente, uno de los ratones inoculados con células T no-transducidas (NT, color gris en **Figura 24B** y tercer ratón NTD en **Figura 25**) en el segundo experimento, fue capaz de revertir la progresión tumoral, probablemente debido a una fuerte alo-respuesta.

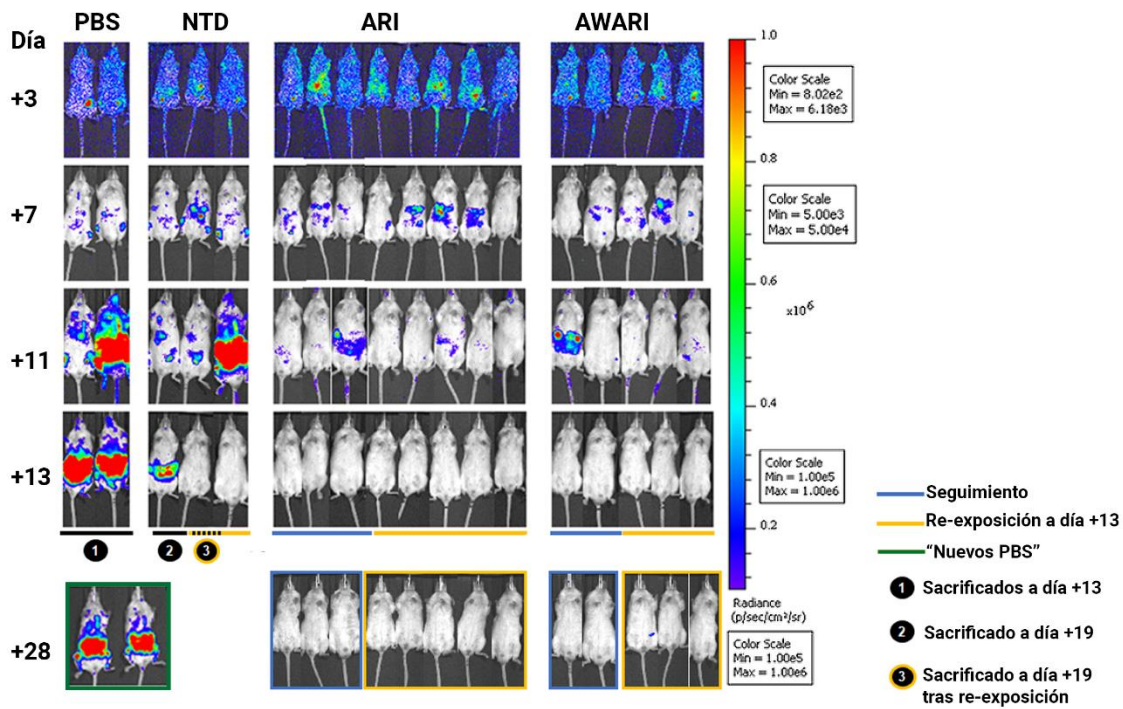


Figura 25. Análisis por bioluminiscencia de la eficacia terapéutica de las células ARI y AWARI CAR-T en modelos xenogénicos de linfoma de Burkitt humano. Se presentan las imágenes obtenidas a los tiempos indicados durante el experimento con dosis alta reflejado en la Figura 24A. Las Imágenes BLI son representativas de la carga tumoral a los días 3, 7, 11 y 13 después de la inoculación con Namalwa y su cuantificación se muestra en la Figura 24B-derecha. Los ratones con barra de color negra fueron sacrificados por punto final humanitario a días 13 y 19 como se indica con los números 1 y 2 respectivamente. El número 3 señala el ratón NT con reexposición a células Namalwa a día 13 que se sacrifica por punto final a día 19. Los ratones enmarcados de color azul son aquellos a los que se les hace un seguimiento, mientras que los de color amarillo han recibido una segunda exposición a las células Namalwa. Los ratones enmarcados en verde corresponden con los ratones control de la segunda exposición inoculados a día 13 como “nuevos PBS”, son sacrificados a día 28 con punto final humanitario. Los ratones de seguimiento y de reexposición ARI y AWARI fueron sacrificados a día 28 por finalización del experimento.

Así, nos planteamos volver a exponer los ratones libres de células tumorales a un segundo encuentro con la intención de mimetizar una posible recidiva tumoral y “forzar” al agotamiento a las células CAR-T. Seleccionamos aleatoriamente 5 animales del grupo de ratones ARI y 3

animales del grupo AWARI para volver a inocularlos con 3×10^5 células Namalwa-GFP-Nluc+ intravenosamente (ratones color azul). En paralelo, inoculamos dos ratones NSGs de edad similar con la misma dosis de células tumorales como control de la progresión de esta segunda exposición. Observamos que ningún ratón tratado con células ARI y AWARI CAR-T, tanto los que tuvieron uno o dos encuentros tumorales, mostraron alguna progresión tumoral ni por bioluminiscencia (**Figura 25**) ni por citometría de flujo tras el procesamiento de los órganos (**Figura 26, abajo**).

Tras el sacrificio, procesamos médula ósea, bazo, hígado, cerebro y sangre para determinar por citometría de flujo la presencia de células tumorales, así como la cantidad y fenotipo de las células CAR-T. Las células tumorales fueron identificadas gracias a la expresión de GFP+ que pudieran estar presentes en los tejidos, lo que nos aporta una medida más sensible que los análisis de bioluminiscencia. En este caso, observamos que tanto los ratones tratados con ARI como AWARI estaban libres de infiltrados tumorales. Sin embargo, se detectó una pequeña cantidad residual de células de Namalwa (menos de <5%) en el hígado de algunos ratones ARI y en el cerebro de algunos ratones AWARI tratados con la dosis baja (**Figura 26, arriba**).

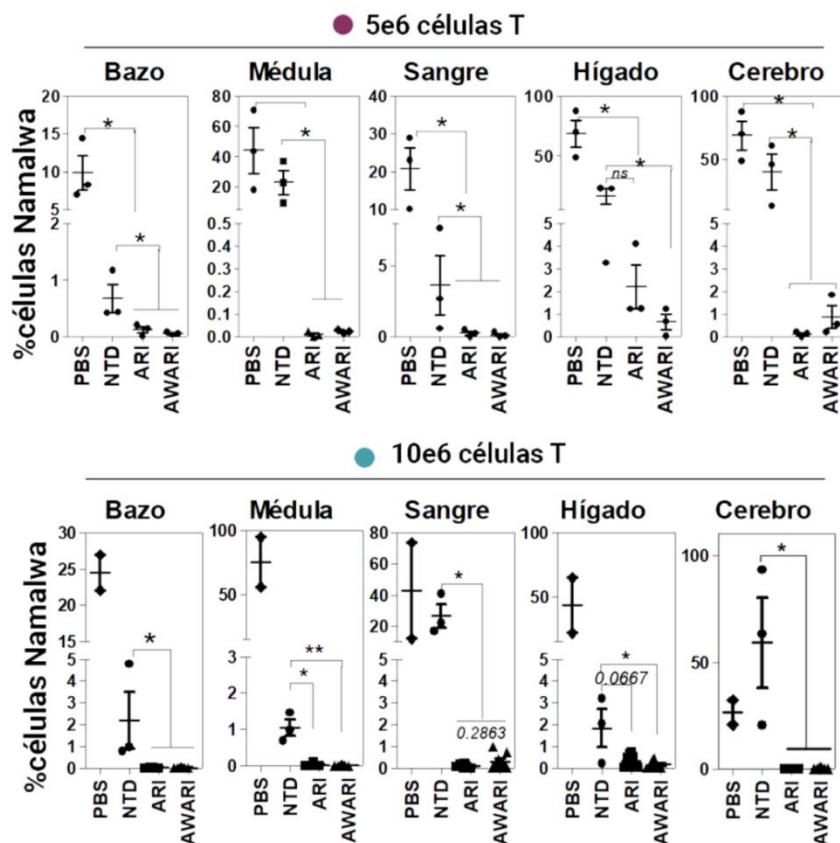


Figura 26. Presencia de células de Namalwa-GFP-Nluc detectadas en bazo, médula ósea, hígado, sangre y cerebro, determinado por FACS después del sacrificio con las dosis bajas (arriba) y altas (abajo). Los diferentes órganos fueron procesados como se indica en M&M. El porcentaje de células Namalwa presentes en las suspensiones celulares obtenidas se analiza por FACS, dentro de la región “células

humanas” y “células humanas-singletes” (ver M&M). Esta región de “células humanas” se determina por FSC y SSC con células Namalwa en cultivo, y posteriormente, se adquieren las diferentes muestras de los ratones. Prueba de Mann-Whitney de dos colas, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ y ***, $p < 0,001$. N (ratones) de dosis baja: PBS = 3, NTD = 3, ARI = 3, AWARI = 3; y dosis alta: PBS = 2, NTD = 3, ARI = 8, AWARI = 5.

Después de mostrar la misma eficacia terapéutica, investigamos los fenotipos de las células CAR-T infiltradas en los diferentes tejidos mediante el análisis de la expresión de los marcadores CD45RA-PE y CD62L-PE-Cy7 dentro de la población teñida como hCD3+CAR+ (**Figura 27A**).

En la **Figura 27B** se indica con un diagrama circular la proporción de cada una de las poblaciones de T_{SCM} (verde), T_{CM} (azul), T_{EM} (gris) y T_{EF} (rojo) de las células CAR-T con una sola exposición (círculo externo) o con dos encuentros con células tumorales *in vivo* (círculo interno). Interesantemente, a pesar de mostrar la misma eficacia terapéutica *in vivo*, las células AWARI-CAR-T exhibían una mayor proporción de células T memoria central (T_{CM} : CD45RA-CD62L +) y T memoria troncales (T_{SCM} : CD45RA+ CD62L+) en las células CAR+, especialmente en la reexposición (círculo interno, asteriscos), siendo esta diferencia significativa entre las poblaciones de T_{SCM} en médula, y el subconjunto de T_{CM} en médula, bazo, hígado y cerebro (círculo interno, 2° encuentro **Figura 27B**).

Con la intención de comparar la tendencia general del fenotipo más indiferenciado, sumamos el porcentaje de células TSCM y TCM en ambos encuentros con células tumorales para cada órgano. De este modo, confirmamos que las células CAR-T AWARI mantenían un fenotipo más deseable a la misma eficacia citotóxica, siendo significativo en bazo, la médula ósea, sangre e hígado en comparación a ratones tratados con ARI (**Figura 27C**).

Además, consideramos importante destacar que la expresión de CAR controlada por los dos vectores se mantuvo en todas las células CAR-T infiltradas en los diferentes órganos después del sacrificio (**Figura 27D**), incluso tras el segundo encuentro, comparándolas con los niveles de expresión *ex vivo* antes de la infusión, lo que indica que no hay silenciamiento de ninguno de los promotores.

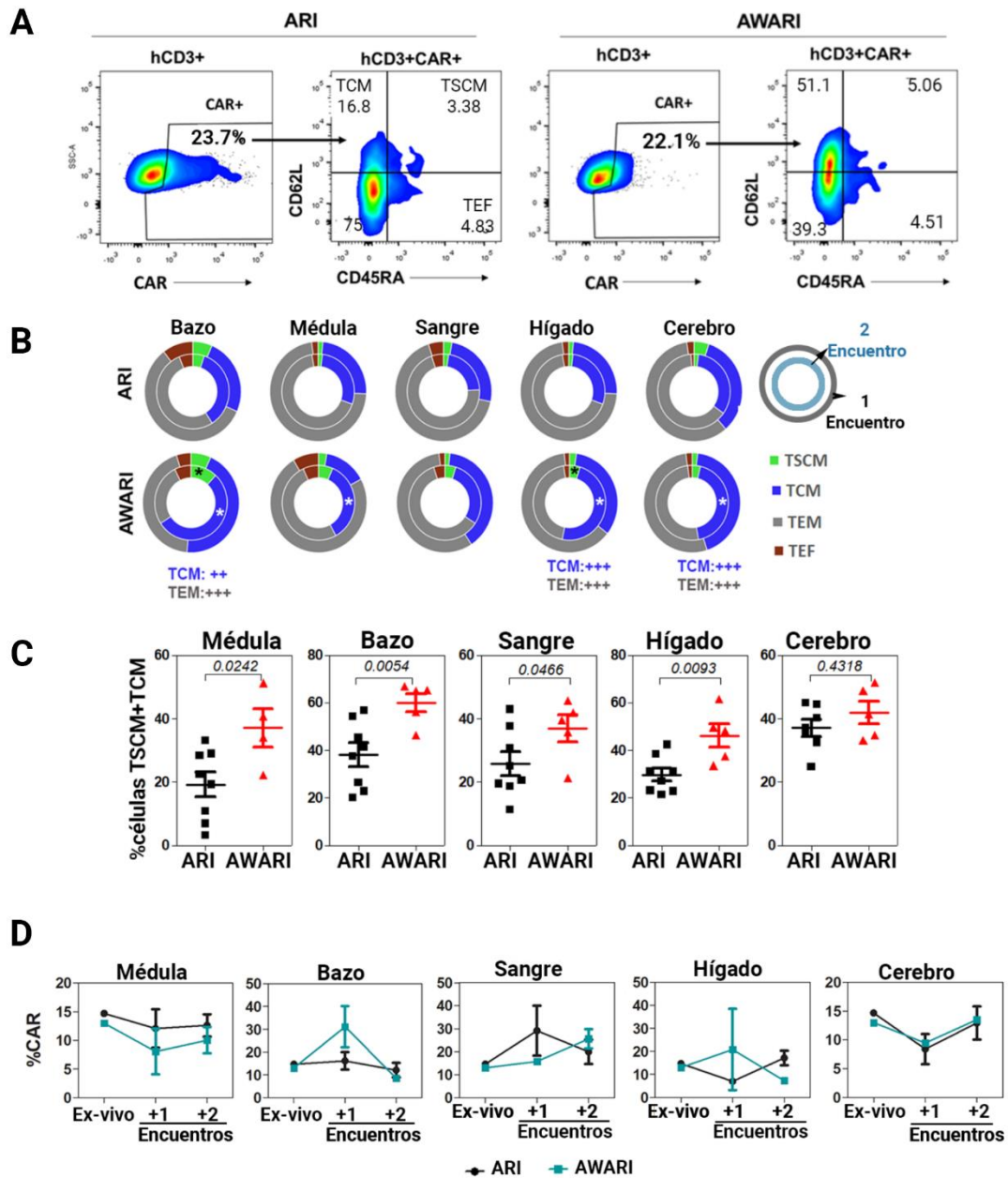


Figura 27. Caracterización fenotípica de las células CAR-T ARI y AWARI infiltradas en los diferentes órganos de los ratones. A) Dot-plots representativos de la estrategia de análisis para determinar la expresión del CAR (primera columna) en las células CD3⁺ humanas y la expresión de CD45RA/CD62L dentro de la región CAR⁺ en el bazo de ratones inoculados con células CAR-T ARI (izquierda) y AWARI (derecha). B) Representación gráfica de los fenotipos encontrados dentro de las células CAR⁺ tras un primer encuentro (círculo externo) y segundo (interno) con las células tumorales. Subpoblaciones T_N/T_{SCM} (CD62L + CD45RA +) (verde), T_{CM} (CD62L+ CD45RA-) (azul), T_{EM} (CD62L-CD45RA-) (gris) y T_{EF} (CD62L-CD45RA +) (rojo). *, p < 0,05 cuando se comparan las subpoblaciones de células CAR- T de ratones tratados con ARI y AWARI re-inoculados. Mann-Whitney de una cola. ++ y +++, cuando p < 0.01 y p < 0.001 respectivamente de ANOVA de 2 vías, post-prueba de Bonferroni de toda la población del total de ratones (ARI = 8 (3 + 5 Re-inoculados, R), AWARI = 5 (2 + 3R). C) Porcentaje de T_N/T_{SCM} y T_{CM} en relación al total de células CAR-T después del sacrificio de los ratones tratados con ARI

y AWARI, analizado dentro de las células hCD3⁺ CAR⁺ (ARI = 8, AWARI = 5), Mann-Whitney de una cola. D) Porcentaje de células CAR⁺ dentro de la población hCD3⁺ en células ARI y AWARI-CAR-T antes de la infusión (*ex vivo*) y 28 días después de su inoculación en ratones con una (+1) o dos (+2) encuentros con las células Namalwa *in vivo* en médula ósea, bazo, sangre, hígado y cerebro.

Para caracterizar aún más las diferencias potenciales entre ambos VLs, procesamos los bazos de ratones tratados con células CAR-T ARI y AWARI, y las cultivamos durante 48h *in vitro* con 200 UI/ml de IL-2 en medio TexMACs (**Figura 28A**) con la intención de enriquecer las células T humanas infiltradas. De este modo, pudimos confirmar el incremento en las poblaciones memoria de células T AWARI infiltradas en el bazo (**Figuras 28B, 28C**) y una tendencia a expresar menos marcadores de agotamiento (PD1 + LAG3 +) (**Figura 28 D**).

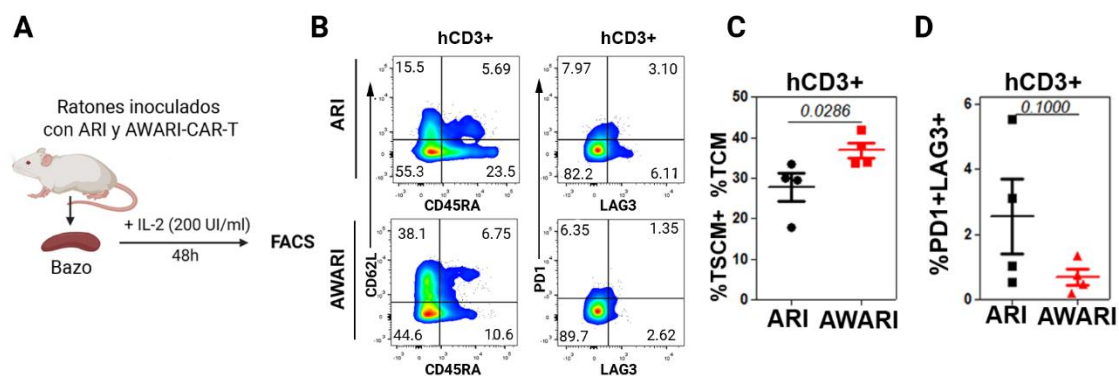


Figura 28. Análisis fenotípico de las células ARI y AWARI-CART infiltradas en el bazo de los ratones tratados. A) Los bazos de los ratones tratados con ARI y AWARI fueron procesados y las suspensiones celulares fueron cultivadas con 200 UI/ml de IL-2 en medio TexMACS y P/S al 2% durante 48 h. B) Gráficos de puntos representativos de poblaciones CD45RA/CD62L y PD1/LAG3 de las células hCD3⁺ procedentes de los ratones tratados con ARI y AWARI. B) Porcentaje de hCD3⁺ TN/TSCM y TCM tras 48 h de cultivo *in vitro*. Prueba de Mann-Whitney de dos colas (N=4). J) Porcentaje de células hCD3⁺ PD1+LAG3 +. Prueba de Mann-Whitney de una cola (N = 4).

4.2 ESCALABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE LAS CÉLULAS CAR-T FISIOLÓGICAS EN UN BIORREACTOR CLINIMACS PRODIGY

Antes de poder aplicar el vector AWARI para la generación de un producto CAR de aplicación clínica, es importante demostrar su rendimiento a gran escala. Para ello, generamos partículas virales AWARI de grado de laboratorio para generar dos lotes células CAR-T (# 01 y # 02) en el biorreactor CliniMACs Prodigy (Miltenyi Biotec) bajo condiciones GMP (ver M&M) en colaboración con la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. Las células fueron descongeladas, seleccionadas por columnas para CD4 y CD8 y activadas con TransAct en medio TexMACs con citoquinas IL-7/IL-15 (**Figura 29A**), todo de grado GMP. A las 48h de activación, las células fueron transducidas con las VLs AWARI. Se

recolectaron muestras en los días 7 y 10 para el lote # 01, y 6 y 9 días para el lote # 02 (Figura 29A). Nuestros colaboradores en el HU Reina Sofia caracterizaron la expresión de CAR (Figura 29B), su viabilidad (Figura 29C), la relación CD4/CD8 (Figura 29E) en los productos obtenidos y nosotros su capacidad citotóxica *in vitro* (Figura 29F) e *in vivo* (Figura 30).

En ambos procesos de producción, las células se expandieron de manera eficiente (Figura 29C), con una transducción entre 15-22% de células CAR positivas (Figura 29B) con un número de copias por célula de 6.50 y 6.44, respectivamente para los lotes #01 y #02.

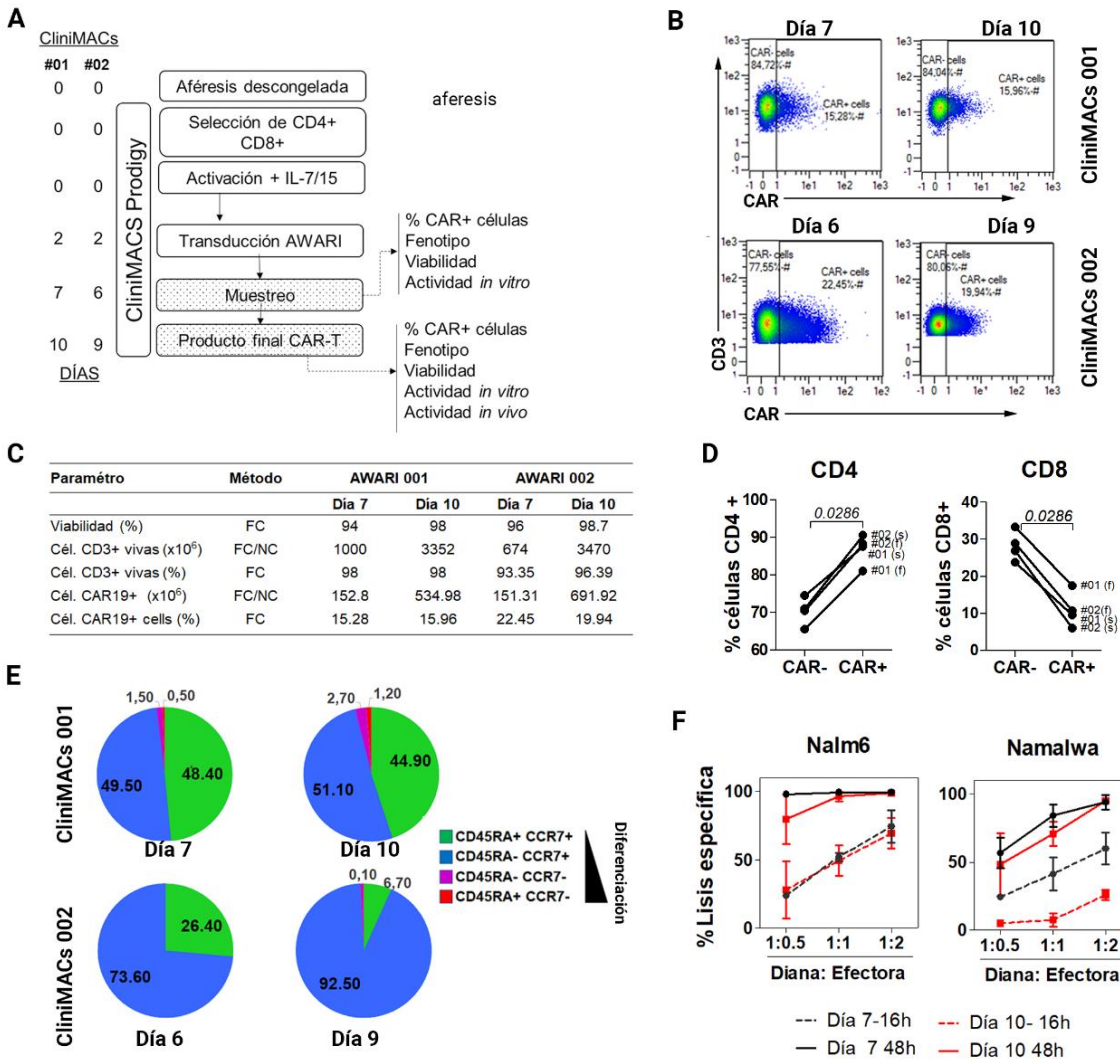


Figura 29. Producción a gran escala de las células AWARI CAR-T en condiciones similares a GMP.

A) Cronograma de las producciones casi-GMP # 01 y # 02 de células AWARI CAR-T en CliniMACS Prodigy. B) Gráficos de puntos de la expresión de CAR en los días de muestra (7/6) y producto final (10/9) para las producciones # 01 (izquierda) y # 02 (derecha). C) Datos de viabilidad, número de células CD3+, eficiencia de transducción de células CAR-T y número de células CAR-T obtenidas. FC = citometría de flujo, NC = recuento de la cámara de Neubauer. D) Variación del porcentaje de células CD4 y CD8 + en células CAR- y CAR + en muestras (s) y productos finales (f). Prueba de Mann-Whitney dos colas. E)

Representación gráfica de las poblaciones de células T en la muestra (días 6 ó 7) y productos finales (día 9 ó 10). $T_{N/TSCM}$ = Naïve/célula troncales memoria (CD45RA+ CCR7+), T_{CM} = memoria central (CD45RA-CCR7+), T_{EM} = memoria efectora (CD45RA-CCR7-) y T_{EM} = efectoras (CD45RA+ CCR7-). F) Lisis específica *in vitro* de células CD19 + células Nalm6 (izquierda) y Namalwa (derecha) células CD19 + por células AWARI CAR-T recolectadas el día de la muestra (días 6/ 7- línea negra) y el día final (días 9/10- línea roja) para las producciones # 01 y # 02. Los productos de células CAR-T se cultivaron conjuntamente en diferentes proporciones durante 16 h (línea discontinua) o 48 h (línea continua).

Se observó también un porcentaje mayor de células CAR+CD4+ que CD8+CAR+ (**Figura 29D**) tanto a tiempo final como en la muestra obtenida (s, *del inglés, sample*) para las dos producciones. Además, comprobamos que el subconjunto predominante de $T_{N/TSCM}$ (CCR7+ CD62L+) ($44,85 \pm 0,07\%$) en los días 7 y 6, se redujo drásticamente en el último día de la producción ($16,55 \pm 13,93\%$), convirtiéndose en células T_{CM} pero con poblaciones mínimas de células T memoria efectoras y efectoras (**Figura 29E**). Como se describe para otros productos de células CAR-T, un menor tiempo de expansión permitió una mayor potencia citotóxica de las células AWARI CAR-T fueran más potentes (**Figura 29F**). Todos estos resultados indican que el vector lentiviral AWARI puede ser una herramienta interesante y viable para un futuro ensayo clínico futuro, aunque una optimización del vector podría aumentar aún más la eficacia de la transducción para reducir los costos y el tiempo de producción.

4.3 LOS PRODUCTOS AWARI-CAR-T PRODUCIDOS A GRAN ESCALA SON MUY EFICIENTES EN LA ELIMINACIÓN DEL TUMOR Y MANTIENEN BUENA PROPORCIÓN DE CÉLULAS T_{SCM} Y T_{CM} *IN VIVO*

Finalmente, caracterizamos las células AWARI CAR-T fabricadas a gran escala el CliniMACs Prodigy en términos de su eficacia antitumoral *in vivo* y su fenotipo, tras su infiltración en los diferentes órganos de los ratones tratados (**Figura 30A**) tanto para el lote CliniMACs#01 (puntos azules) como para el lote#02 (puntos verdes). En el primer experimento con células del CliniMACs #01, sacrificamos dos ratones tratados con AWARI junto con los ratones control que necesitaron de punto final humanitario para la caracterización de su fenotipo a tiempo temprano (día 13, **Figura 32A**) vs el final del experimento a día 30.

La actividad antitumoral de ambos productos de células AWARI CAR-T se analizó en el modelo de ratones inoculados con Namalwa-GFP-Nluc como se muestra en la **Figura 30A**. La supervivencia (**Figura 30B**) y la progresión del tumor (**Figuras 30C y 30D**) fueron analizadas hasta 28-30 días después del tratamiento, mostrando una fuerte actividad antitumoral de las células AWARI CAR-T con una supervivencia del 100% y con niveles indetectables de células

tumorales en los ratones tratados (Figuras 30B, 30C, 30D y Figura 31A).

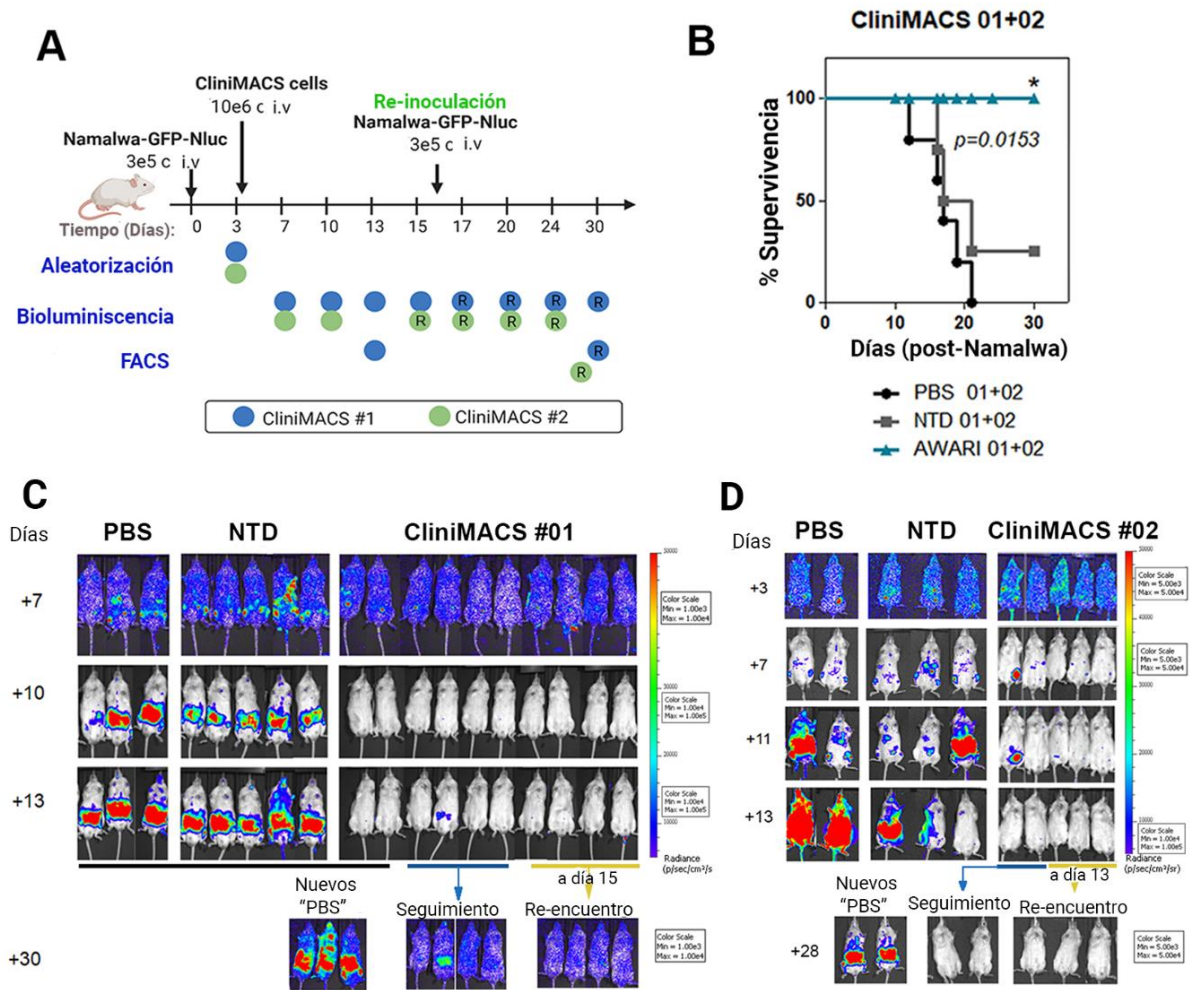


Figura 30. Actividad antitumoral *in vivo* de células AWARI-CAR-T producidas por CliniMACS después de una o dos exposiciones a células tumorales de linfoma. A) Diseño experimental y cronograma de los dos experimentos con la producción de CliniMACS #01 y #02. R indica Re-inoculación. En el CliniMACS #01, algunos animales fueron sacrificados a día 13 (como punto final humanitario y muestreo por FACS) y a punto final del experimento (día 30, puntos azules). En el experimento con células del CliniMACS#02, los animales fueron sacrificados a día 30 y se procesaron para su análisis por FACS. B) Supervivencia de ratones inoculados con PBS, NTD o AWARI de los productos #01 y #02. * indica $p=0.0153$ con el test log-rank (Mantel-Cox). C, D) Imágenes BLI representativas de la carga tumoral medida de los experimentos con el lote #01 (C) y #02 (D) en días diferentes después de la inoculación con *Namalwa*. En ambos estudios, en el día 15 (#01) ó 13 (#02) respectivamente, se inocularon nuevas células *Namalwa* a ratones tratados con AWARI (reexposición, línea amarilla) o ratones de control ("nuevos PBS"). El grupo marcado con azul fue analizado para su seguimiento.

Con la intención de mimetizar una recidiva del linfoma de Burkitt, se inocularon nuevas células *Namalwa* en ratones tratados con células AWARI-T en una segunda exposición y también en ratones NSG nuevos, de edad similar ("Nuevos PBS") como control de la progresión tumoral.

Los ratones AWARI re-expuestos (**color amarillo, Figuras 30 C, D**) permanecieron libres de células tumorales durante la duración del experimento, al igual que el grupo de seguimiento (con tan solo una inoculación, color azul), exhibiendo resultados similares en ambas producciones (**Figuras 30C, 30D**). Tras su sacrificio, los órganos se procesaron para FACS y tampoco detectamos la presencia de células tumorales GFP+ en ninguno de los órganos analizados (médula ósea, bazo, sangre, hígado y cerebro) de los ratones tratados con AWARI tras una o dos re-exposiciones (R, **Figura 31A**)

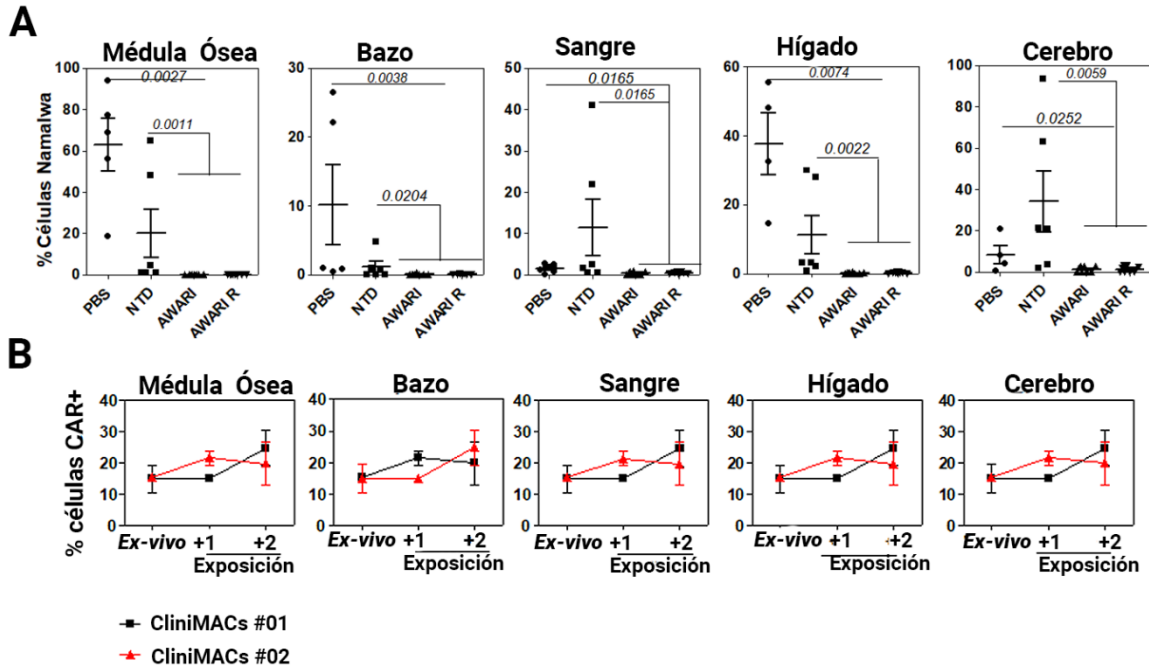


Figura 31 Análisis de infiltrados de células de linfoma y de células AWARI en los diferentes órganos de los ratones tratados. A) Porcentaje de células de Namalwa supervivientes de los experimentos ClinIMACS n° 01 y n° 02 con una o dos reexposiciones (R) *in vivo* con Namalwa-GFP-Nluc. Los datos fueron analizados por FACS en el punto final. B) Porcentaje de células CAR+ dentro de la población hCD3+ en células AWARI-CAR-T de las dos producciones de ClinIMACS, analizadas *ex vivo* (pre-infusión) y 28 o 30 días después de su inoculación en ratones con una (+1) o dos (+2) exposiciones a células tumorales Namalwa. Se muestran datos de médula ósea, bazo, sangre, hígado y cerebro.

Analizamos también el porcentaje de células hCD3+ CAR+ del ClinIMACs #01 (color negro) y ClinIMACs#02 (color rojo) en los diferentes órganos (**Figura 31B**), tras una o dos exposiciones. Corroboramos la presencia de células CAR+ que se mantuvieron después de la eliminación *in vivo* de las células de Namalwa en el modelo de ratón comparado con los valores iniciales previos a la infusión (*ex vivo*), incluso con un ligero enriquecimiento de esta población CAR+ en algunos de los órganos tras la segunda exposición (**Figura 31B**).

Por otro lado, los ratones control inoculados con PBS y con células T no transducidas (NTD) desarrollaron la enfermedad a tiempos similares y la mayoría tuvo que ser sacrificados por razones compasivas en el día 13 tras la inoculación tumoral. Con la intención de realizar un primer análisis del fenotipo, se sacrificaron dos ratones AWARI sin señal bioluminiscente (sin presencia tumoral) del experimento CliniMACs #01. Tras el procesamiento de los diferentes órganos, se analizó el fenotipo en base a la expresión de CD45RA y CD62L de la población CAR+ dentro de la región hCD3+ (como se muestra en el dot-plot representativo de la **Figura 32A**, en una muestra de médula ósea de un ratón con células NT y un ratón con células AWARI #01). Observamos mediante citometría de flujo, que se mantuvo claramente un fenotipo menos diferenciado con una suma de las poblaciones T_{SCM} y T_{CM} presentes células CAR-T humanas procedentes de ratones tratados con AWARI a día 13 (panel superior, **Figura 32B**, color negro en el experimento #01). Aunque, la proporción de estos subconjuntos T_{SCM}+T_{CM} se redujo significativamente al final del experimento en algunos órganos como sangre o hígado (**Figura 32B**, arriba), esa proporción de células más indiferenciadas se mantuvo alta, llegando en algunos casos al 90%.

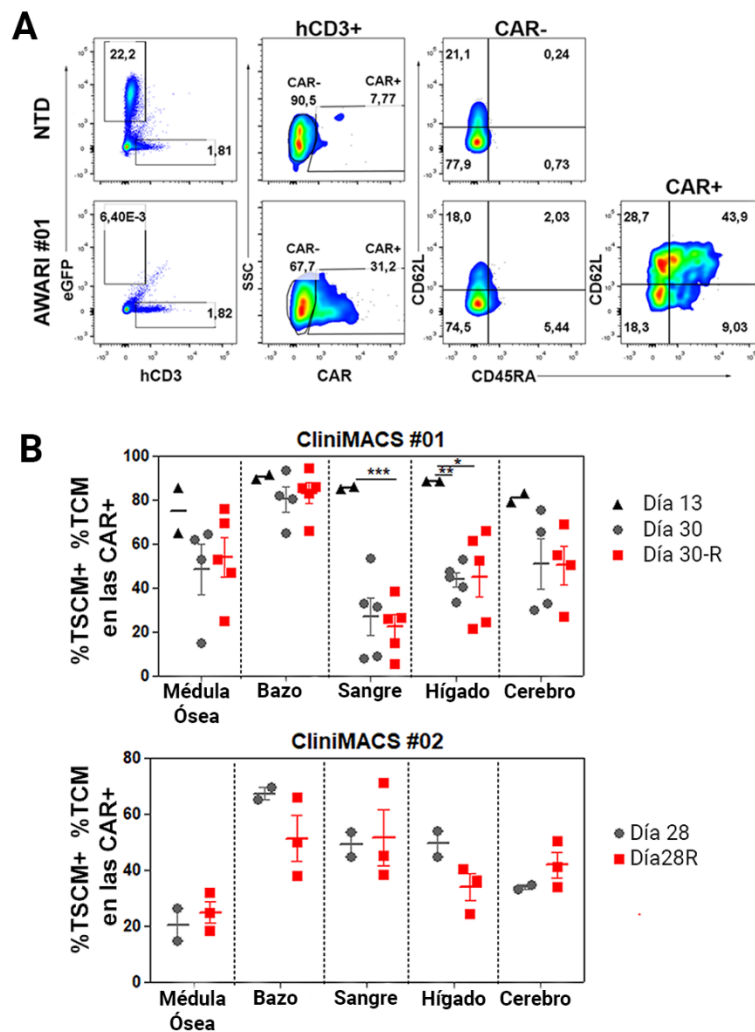


Figura 32. Análisis del fenotipo de células AWARI-CAR-T producidas en el CliniMACS después de uno o dos exposiciones a células Namalwa *in vivo*. A) Dot-Plots representativos de la presencia de Namalwa/hCD3, células hCD3+ CAR+ y el fenotipo de las células hCD3+CAR- y CAR+ de células NTD y AWARI CliniMACS# 01 de médula ósea después del sacrificio a día 13. B) Porcentaje de población $T_{N/SCM} + T_{CM}$ en células hCD3+ CAR+ analizadas en los diferentes ratones con una o dos inoculaciones de células tumorales Namalwa en ratones tratados con las AWARI CliniMACS #01 (arriba) y # 02 (abajo). Sólo se incluyeron los datos cuando la población CAR + era > 1%. N (CliniMACS # 01): PBS = 3, NTD=5, AWARI=10 (2 sacrificados el día 13, 4 ratones con una inoculación tumoral y 4 con ratones con reinoculación de las células tumorales. N (CliniMACS #02): PBS=2, NTD=3, AWARI=5 (2+3 ratones reinoculados) ANOVA de 2 vías, Bonferroni Post Test, *, indica $p < 0,05$, **, $p < 0,001$, ***, $p < 0,0001$.

El porcentaje de células CAR+ (**Figura 32B**) se mantuvo después de la eliminación *in vivo* de las células de Namalwa en el modelo de ratón comparado con los valores iniciales previos a la infusión (*ex vivo*) con un ligero enriquecimiento de esta población CAR+ en algunos de los órganos (**Figura 32B**). Es importante destacar que el análisis fenotípico confirmó la presencia de una alta proporción de poblaciones de T_{SCM}/T_{CM} (**Fig. 30E, 30 F y 31C, D**) en el punto final de los ratones con uno y dos encuentros con las células tumorales. Sin embargo, estas poblaciones fueron claramente reducidas desde el día 13 hasta el día 30 (panel superior de la **Fig. 30F y Fig 31C**).

Así, estos datos corroboran los resultados *in vitro* (objetivo III) e *in vivo* que muestran que la expresión del CAR ARI-CAR19-BBzz a través de un promotor cuya expresión mimetiza el patrón del TCR (células AWARI-CAR-T) mantiene la proporción de T_{SCM}/T_{CM} células CAR-T tras el encuentro con su antígeno tumoral.

RESULTADOS: PARTE IV

GENERACIÓN DE CÉLULAS T- INDUCIBLES BASADOS EN EL SISTEMA TET-ON LIBRE DE TRANSACTIVADORES COMO POTENCIAL HERRAMIENTA DE APLICACIÓN EN INMUNOTERAPIA

5.1 LOS VECTORES INDUCIBLES “TODO-EN-UNO” BASADOS EN EL TETR ORIGINAL REQUIEREN LA PRESENCIA DE AISLADORES PARA UNA REGULACIÓN ESTRICTA EN CÉLULAS T PRIMARIAS

En esta parte, nuestro objetivo pretende explotar el potencial de los sistemas inducibles por doxiciclina desarrollados por el grupo (Benabdellah *et al.* 2011 y 2016) para controlar la expresión de ciertos genes de relevancia terapéutica como herramienta futura para inmunoterapia. Una de las principales ventajas de estos sistemas “todo-en-uno” (en un solo vector) es que no requieren de transactivadores, lo cual facilita su traslación a clínica. Las células T primarias ejercen un rol clave en diferentes estrategias de inmunoterapia por lo que decidimos evaluar el comportamiento de estos vectores lentivirales basados en el sistema Tet-On en estas células.

Se tratan de VL-SIN (autoinactivados) (**Figura 33A**) que van a regular la expresión de eGFP únicamente a través del promotor del citomegalovirus (CMV-TetO), el cual posee sitios de unión TetO donde se va a unir el represor original (TetR) en ausencia de derivados de tetraciclinas, evitando su expresión. Este represor TetR tiene una secuencia de localización nuclear (NL2), y su expresión está controlada por el promotor SFFV en el caso de CEST (Benabdellah *et al.* 2011) o CESTIs2, o por el promotor EF1 α en el caso de los sistemas Lent-On-Plus (LOP) CEET y CEETIs2 (Benabdellah *et al.* 2016). Los VLs CESTIs2 y CEETIs2 incluyen, además, el elemento aislador Is2 (Benabdellah *et al.* 2014) dentro del 3' Δ U3LTR, de modo que una vez integrados, gracias al proceso de retrotranscripción, nuestro transgén de interés queda flanqueado por un elemento Is2 a cada lado, limitando así procesos de silenciamiento génico y favoreciendo una expresión más independiente del contexto del sitio de integración del vector (Benabdellah *et al.* 2014, Sánchez-Hernández *et al.* 2018).

En primer lugar, estudiamos el comportamiento de los vectores TetON en un modelo de células T immortalizadas (**Figura 33B**). Para ello, transdujimos células Jurkat con los vectores Tet-On CEST y LOP y añadimos 10ng/ml de doxiciclina (Dox) a las 72h, realizando un seguimiento por citometría de flujo de la expresión de GFP en ausencia o presencia de Dox hasta 28 días (**Figura 33B**). Así, observamos que los sistemas Lent-On-Plus (CEET y CEETIs2; denominados en adelante LOP y LOPIs2) limitaban casi por completo la expresión de GFP en ausencia de Dox (**Figura 33C**, histogramas azules), mientras que los vectores CEST y CESTIS2 expresaban niveles muy altos (**Figura 32C**, paneles de la izquierda, histogramas azules). En presencia de Dox, todos los vectores generaron un incremento de la expresión de eGFP (**Figura 32C**, histogramas verdes).

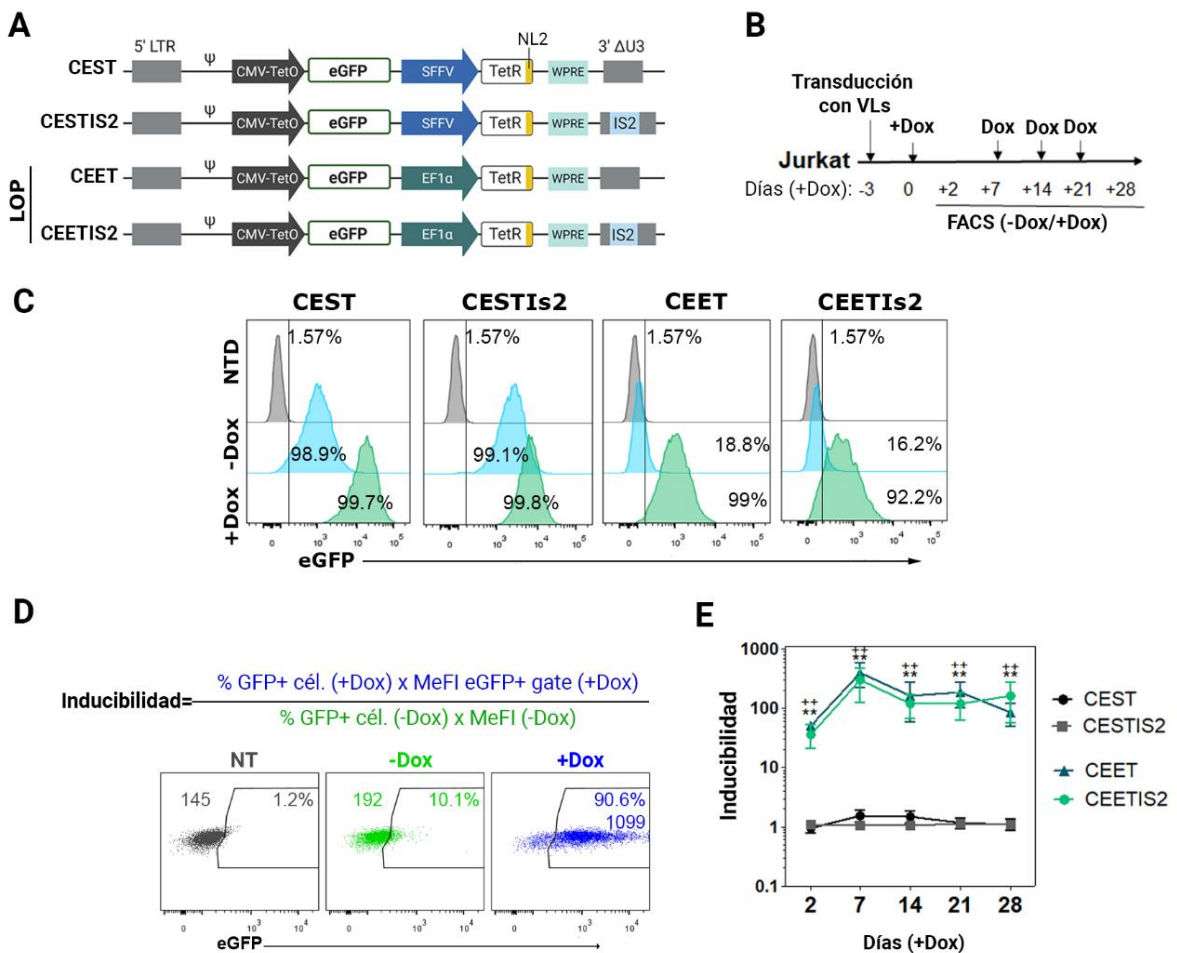


Figura 33. Comportamiento de los vectores Tet-On en células T immortalizadas. A) Esquema de los VLs utilizados. B) Cronograma experimental. C) Histogramas representativos del comportamiento de los vectores CEST, CESTIs2, CEET y CEETIs2 en células Jurkat. Los análisis se realizaron sobre células Jurkat establecidas que fueron transducidas con los diferentes VLs a MOI=1 y sorteadas en la población eGFP+ (ver M&M). Las diferentes líneas Jurkat/CEST (1.75 ± 0.78 copias/célula), Jurkat/CESTIs2 (0.92 ± 0.03 c/c), Jurkat/CEET (4.14 ± 1.47 c/c), Jurkat/CEETIs2 (1.5 ± 0.265 c/c) se incubaron en ausencia (histogramas azules) o presencia de 10 ng/ml Dox (histogramas verdes) y fueron analizados 7 después.

NTD indica células no transducidas. D) La fórmula de inducibilidad es inversamente proporcional al *leaking* (expresión en ausencia de Dox) y directamente proporcional al incremento que se observa en los niveles de expresión en presencia de Dox (tanto en % como en MeFI). El cálculo de la inducibilidad se realiza por tanto multiplicando el % de células eGFP+ por el MeFI de la población eGFP+ en presencia de Dox (Plot azul en el ejemplo), dividido por el mismo valor obtenido en ausencia de Dox (Plot verde en el ejemplo). Se usaron células no transducidas para establecer el límite de células positivas y ese valor fue sustraído. E) Seguimiento de la inducibilidad durante 28 días. **, indica $p < 0.01$, test ANOVA dos-colas.

El concepto de inducibilidad considera el porcentaje y la intensidad de la expresión de GFP (MeFI, mediana de fluorescencia) tanto en presencia como en ausencia de Dox (**Figura 33D**), por lo que un vector que no tiene “*leaking*” (en ausencia de Dox), tendrá una alta inducibilidad. Así, la inducibilidad fue significativamente mayor para los vectores Lent-On-Plus y se mantuvo estable a lo largo del tiempo (**Figura 33E**).

A continuación, evaluamos el comportamiento de los cuatro VLs-TetOn en células T primarias previamente activadas (**Figura 34A**, arriba). En este caso, todos los vectores, excepto el CEETIs2, presentaban *leaking* (**Figura 34A**, abajo) y no consiguieron regular en los 36 días de seguimiento (**Figura 34B**). La inducibilidad del vector CEETIs2, a pesar de tener un porcentaje de transducción bajo, se fue incrementando a lo largo del tiempo, bajando el *leaking* inicial e incrementándose la intensidad de fluorescencia. El hecho de que el CEET no sea capaz de regular en células T primarias, mientras que el CEETIs2 lo haga de manera muy eficaz confirma la utilidad del elemento Is2 para aislar al vector de potenciales activadores (“*enhancers*”) presentes en el sitio de inserción (Benanabdellah *et al.* 2014). También hace evidente que el efecto del aislador depende en gran medida del tipo celular, tal y como fue descrito previamente, dado que esto no se observa en células Jurkat, donde tanto el CEET como el CEETIs2 regulan muy eficazmente. Debido a la presencia del Is2 en el LTR, el vector CEETIs2 es el que genera el título (unidades transductoras por mililitro, UT/ml) más bajo de todos los VLs analizados. Aunque esto solo limita algunas aplicaciones potenciales, sí que es un factor a tener en cuenta en relación al tamaño del gen de interés (GOI) que podremos expresar (**Figura 34C**).

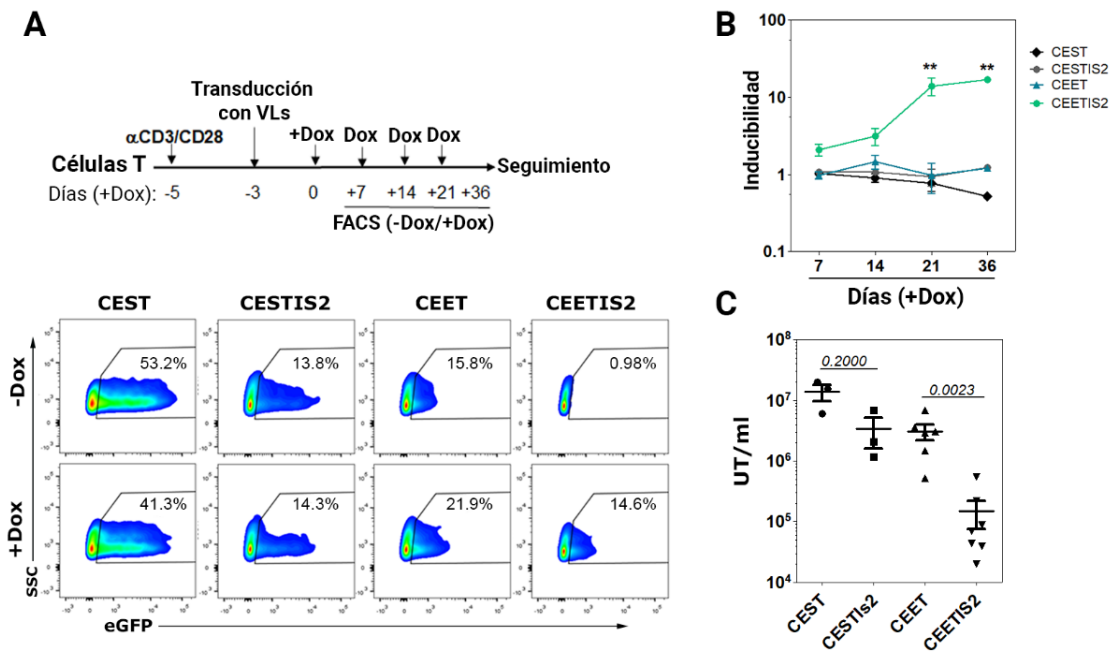


Figura 34. Comportamiento de los diferentes VL-TetOn en células T primarias. A) Arriba: Cronograma del experimento realizado en células T primarias. Las células T se activaron con α CD3/CD28 durante las 48 h previas a la transducción con los diferentes VLs. Las células T transducidas se mantuvieron en cultivo tanto en ausencia como en presencia de 10ng/ml de Dox durante 36 días. Abajo: Dot-plots representativos de la expresión de eGFP en ausencia (plots de arriba) o presencia (plots de abajo) de Dox (10 ng/ml) de células T transducidas con los VLs CEST (5.5 copias/célula), CESTIS2 (0.27 c/c), CEET (2.09 c/c) y CEETIS2 (0.24 c/c) con 100 μ l de virus y analizadas el día 21. B) Representación gráfica de la inducibilidad de los diferentes vectores en presencia de Dox a lo largo del tiempo en células T primarias (36 días; n = 3). Test ANOVA, dos colas. **, p < 0.01. C) Título viral de los diferentes VLs inducibles, CEST, CESTIS2, CEET y CEETIS2, calculados en células Jurkat. Se presenta como Unidades de transducción por ml (UT/ml). Test no paramétrico Man-Whitney, dos colas.

A continuación, se analizó si los niveles de regulación de los VLs CEET y CEETIS2 (los únicos capaces de regular en células Jurkat) variaban en función del estado de diferenciación de las células T primarias. De acuerdo con los marcadores CD45RA y CD62L, definimos 4 subpoblaciones de células T (**Figura 35A**, plot central); 1) células T madre memoria/ T naïve o T_{SCM/T_N} (CD45RA + CD62L +); 2) las células T memoria central ó T_{CM} (CD45RA-CD62L +), 3) las células T memoria efectoras ó T_E (CD45RA + CD62L -) y 4) células T efectoras memoria ó T_{EM} (CD45RA - CD62L-) y encontramos que nuevamente sólo los CEETIS2 pudieron regular con precisión la expresión de eGFP de una manera muy similar en todas las poblaciones (**Figura 35A y B**).

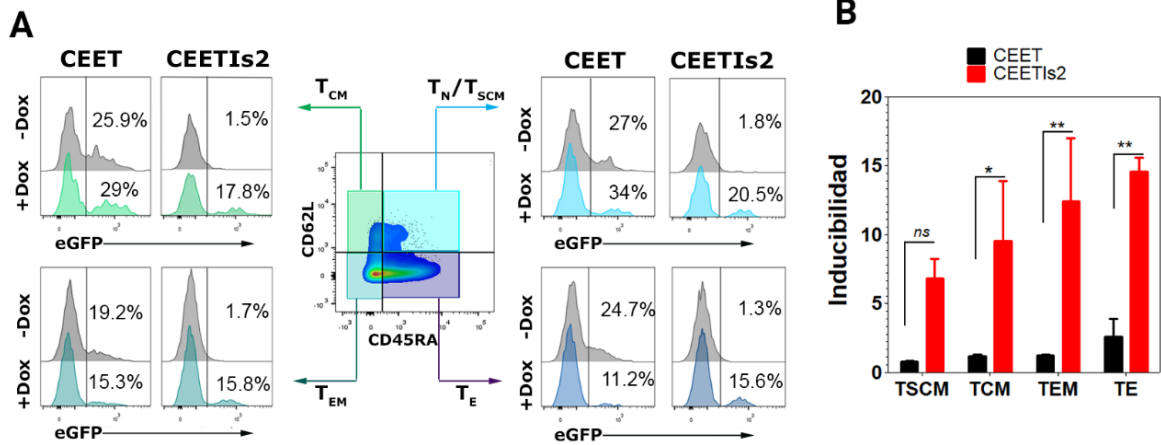


Figura 35. Análisis de la inducibilidad de los vectores CEET y CEETIs2 en los diferentes estadios de diferenciación de las células T primarias. A) Histogramas representativos de la expresión de eGFP impulsada por LOP y LOPIS2 en los diferentes sub-poblaciones de células T definidos por los marcadores de diferenciación CD45RA y CD62L (plot central) en presencia (histogramas de colores) o no (histogramas grises) de Dox (10 ng/ml). Las células T fueron transducidas con CEET y CEETIs2 con un MOI = 5 y 10 días después analizadas por citometría de flujo para la expresión de eGFP, CD45RA y CD62L: T_{N/SCM}: CD45RA+CD62L+ (azul), T_{CM}: CD45RA-CD62L + (verde), T_{EFM}: CD45RA-CD62L- (verde oscuro), T_E: CD45RA + CD62L (azul oscuro). B) Inducibilidad de LOP y LOPIS2 en las diferentes subpoblaciones de células T definidas en el día 21 (n = 3). Test ANOVA, dos colas. **, p <0,01; ***, p <0,001.

5.2 EL AISLADOR IS2 HA DE LOCALIZARSE DENTRO DEL LTR PARA UNA EXPRESIÓN CONTROLADA EN LAS CÉLULAS T PRIMARIAS.

Con la intención de mejorar el título viral sin afectar a la regulación, generamos una nueva batería de vectores CEET incluyendo diferentes elementos aisladores y SARs (secuencias de unión a la matriz nuclear) fuera del LTR (**Figura 36A**). La potencial desventaja de estas configuraciones es que, una vez el vector esté integrado, el casete de expresión no estará flanqueado por los elementos aisladores, sino que sólo se encontrará en el extremo 5'.

Clonamos así a los elementos pSAR2 (Benabdellah *et al.* 2014) e Is2 en el sitio XhoI y pSAR1 (Benabdellah *et al.* 2014), HS4_650 (Malik *et al.*), Hs4_ext, IFN β SAR e IFN β IgKSAR (Benabdellah *et al.* 2014) en el sitio KpnI. Todos estos aisladores contienen diferentes dominios como se representa en la **Figura 36A**. Todos los aisladores fuera del LTR mejoraron el título viral eficiente (calculado en células Jurkat) (**Figura 36B**).

En primer lugar, determinamos el efecto de las modificaciones en la eficacia de producción de los diferentes vectores. Al eliminar el Is2 del LTR se incrementó el título de todos los nuevos vectores CEET, observando un mayor porcentaje de células expresando eGFP en presencia de Dox en células Jurkat (**Figura 36 B**).

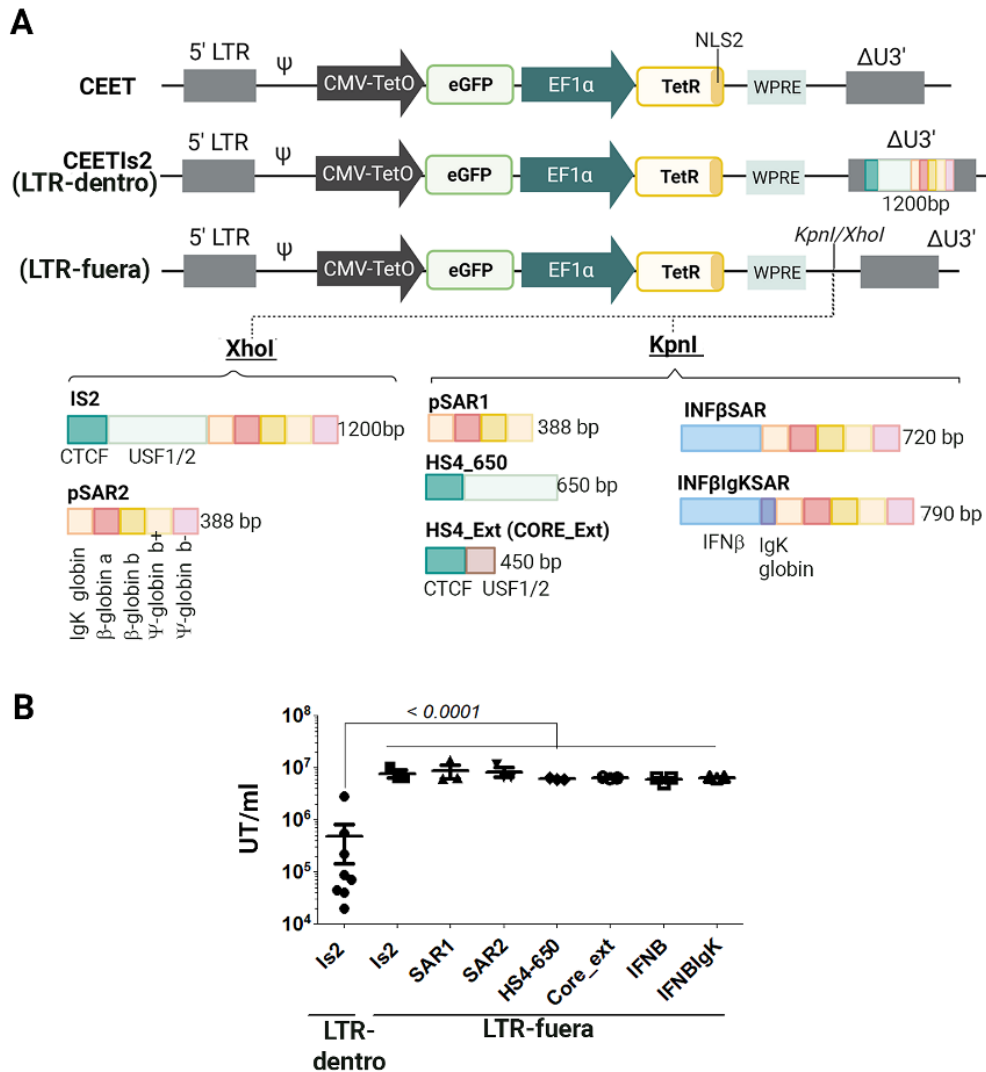


Figura 36. Vectores LOP con elementos aisladores fuera del LTR. A) Diagrama comparativo de los VLS CEET y CEETIs2 (arriba) con VLS CEET que incluyen los elementos Is2, pSAR1, pSAR2, HS4_650, Core_ext, IFN β e IFN β SAR fuera del LTR, en los sitios KpnI/XhoI. B) Título viral dado como unidades transductoras (UT/ml) y calculado en células Jurkat. Test ANOVA dos colas, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

A continuación, evaluamos la inducibilidad de estos nuevos vectores en diferentes líneas celulares, que incluyeron células T inmortalizadas (Jurkat), células Namalwa y Nalm6 (de linaje B) (**Figura 37A**) y células T primarias (**Figura 37B**). Las diferentes células fueron transducidas con 40 μ l de cada VL para Jurkat, Namalwa y Nalm6 y 100 μ l para células T primarias, previamente activadas.

Tal y como se observó en células Jurkat, la eliminación del elemento Is2 del LTR incrementó la eficacia de transducción en todos los nuevos vectores CEET en las diferentes líneas celulares, observándose un mayor porcentaje de células expresando eGFP en presencia de Dox (**Figura 37C**, histogramas en azul). Además, como era de esperar, los diferentes vectores CEET con los distintos aisladores tenían un comportamiento diferente dependiendo del tipo celular. Así,

en Jurkat (**Figura 37C**) y en células T primarias (**Figura 37D**), todos los nuevos VLs CEET incrementaban el MeFI de eGFP en presencia de Dox comparados con el CEETIs2. Sin embargo, esto no se observa ni en Nalm6 ni en Namalwa (**Figura 37C**, histogramas en azul).

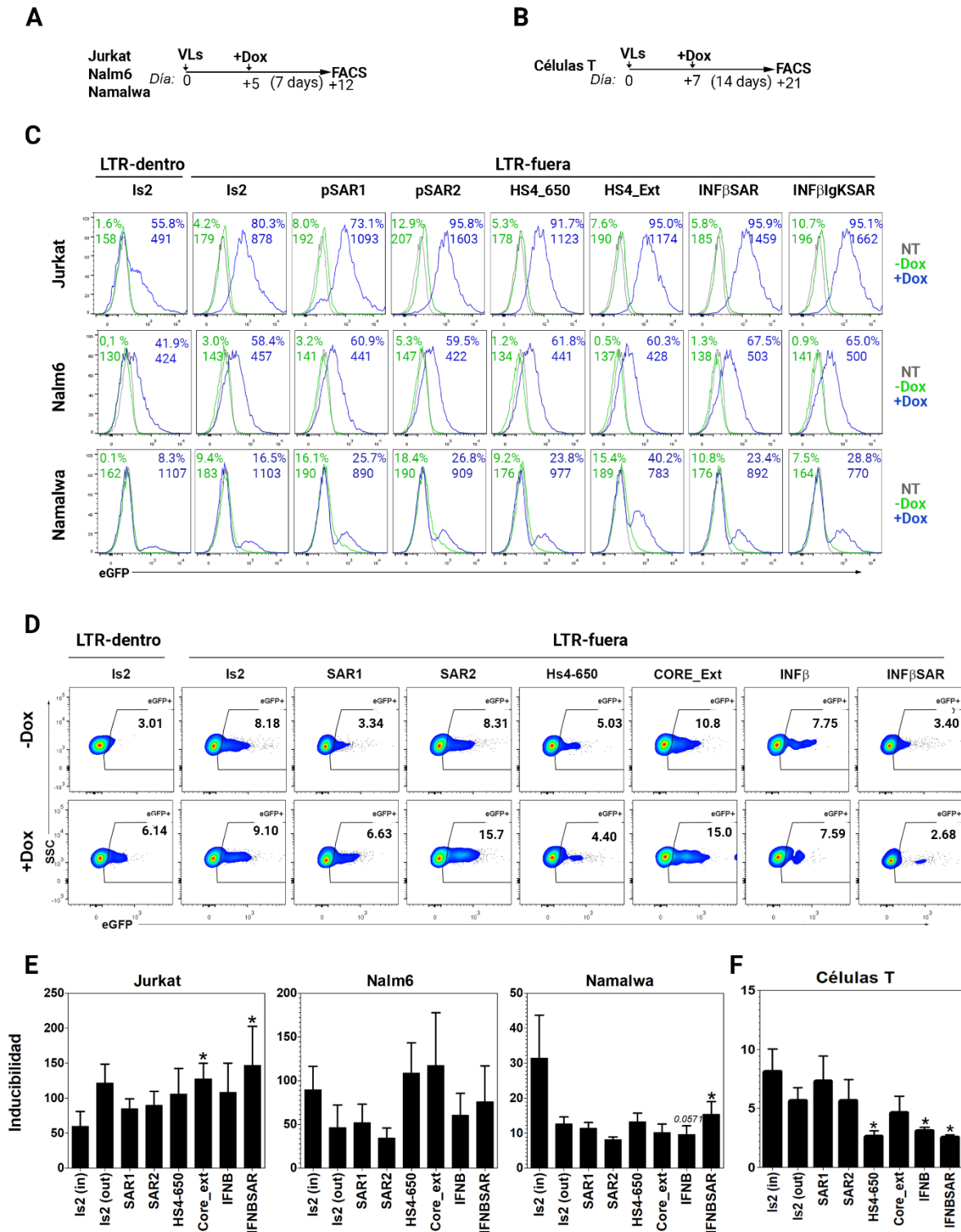


Figura 37. Evaluación del comportamiento de los nuevos aisladores en diferentes tipos celulares. A) Representación de los experimentos realizados con líneas celulares (Jurkat, Nalm6 y Namalwa) y B) linfocitos T primarios. C) Histogramas representativos de la expresión de eGFP dada por los diferentes VL-

aisladores en las células Jurkat, Nalm6 y Namalwa en ausencia o presencia de Dox (10 ng/ml) a día 12 después de la transducción. Se muestran las condiciones no-transducidas, NT (línea gris punteada), -Dox (verde) y +Dox (azul) para cada VL. Los valores del porcentaje (%) y MeFI de eGFP en presencia o ausencia de Dox para cada vector CEET son incluidos en la parte superior de cada histograma en color verde (-Dox) y azul (+Dox). D) Dot-Plots representativos de la expresión de eGFP dada por los VLs en células T primarias en ausencia o presencia de Dox (100 ng/ml) en el día 21 después de la transducción. Los valores del porcentaje (%) en presencia o ausencia de Dox son incluidos en la parte superior de cada dot-plot. E) Representación gráfica de la inducibilidad de cada VL en las líneas celulares. Jurkat (n=4), Nalm6 y Namalwa (n=3), T-Test Mann-Whitney no paramétrica*, indica $p < 0.05$. F) Representación gráfica de la inducibilidad de cada VL en células T primarias (n = 4). T-test Mann-Whitney no paramétrico, una cola. Los datos representados son la media \pm SEM.

En cualquier caso, si lo que pretendemos es mejorar la eficacia del CEETIs2, no sólo debemos mirar el título y la MeFI en presencia de Dox, sino debemos determinar en qué medida los nuevos CEET mejoran la inducibilidad en los diferentes tipos celulares y, en particular, en las células T primarias. Para ello es fundamental que se mantengan niveles mínimos de expresión en ausencia de Dox. Sin embargo, como puede observarse en los diferentes histogramas y dot-plots, todos los nuevos CEET expresan mayores niveles (tanto en % como en MeFI) de eGFP en ausencia del inductor (**Figura 37C y D**, histogramas y datos en verde). Esta incapacidad de los nuevos vectores CEET de bloquear completamente la expresión de eGFP cuando el inductor no está presente, es especialmente relevante en células T primarias, donde el único vector CEET capaz de evitar el *leaking* es el CEET-Is2 dentro del LTR (**Figura 37D**, plots de arriba, izquierda). Utilizando la fórmula de la inducibilidad, podemos determinar que algunas de las nuevas construcciones (CEET-IFN β SAR y CEET-Core-ext) sí que mejoran este parámetro en células Jurkat (**Figura 37E**, grafica de la izquierda), pero no lo hacen en ninguna de las otras líneas y menos aún en las células T primarias, donde la inducibilidad se ve muy reducida debido a la alta expresión en ausencia de Dox (**Figura 37F**).

5.4 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA LOP-IS2: REGULACIÓN EN DIFERENTES TIPOS CELULARES, INDUCIBILIDAD *IN VITRO* E *IN VIVO*, SENSIBILIDAD A DOX

Dado que los vectores Lent-on-Plus (LOP) con Is2 en el LTR (LOPIs2, CEETIs2) fueron los únicos que no presentaron *leaking* en las células T primarias, nos centramos a continuación en su caracterización en profundidad. Para ello, en primer lugar generamos unos nuevos vectores LOP, CELET y CELETIS2 (**Figura 38A**) expresando un polipéptido que pudiera ofrecernos mayor versatilidad en los análisis de inducibilidad: eGFP-2A-Nluc. Este polipéptido se procesa en las células donde se expresa dando lugar a eGFP y NLuc capaces de ser detectados por

citometría de flujo y por luminiscencia, respectivamente, permitiendo realizar análisis de inducibilidad en modelos animales.

En segundo lugar, se procedió a evaluar la inducibilidad de CELET y CELETIs2 en diferentes líneas celulares de origen hematopoyético (K562, Jurkat, Namalwa y Nalm6), de carcinoma pancreático (MiaPaCa2) y fibroblastos de riñón embrionario (293T) (**Figura 38B**). Para ello se procedió a transducir dichas células con 50µl de los VLs CELET o de CELETIs2 y a su análisis por citometría a los 7 días. Al igual que se observó previamente con los vectores CEET y CEETIs2 (expresando eGFP), los VLs CELETIs2 fueron los únicos capaces de bloquear la expresión casi por completo en todas las líneas celulares analizadas (**Figura 38B, 38C**, los histogramas verdes indican la expresión en ausencia de Dox), mientras que los CELET, sin IS2, siempre exhibe unos niveles de expresión mayores en ausencia de Dox (*leaking*), sobre todo en K562, Namalwa, Nalm6, MiaPaCa2 y 293T. Este hecho se puede observar más claramente utilizando la fórmula de la inducibilidad, donde se muestra que los VLs CELETIs2 presentan un mejor comportamiento en todas las líneas salvo en Jurkat (**Figura 38C**).

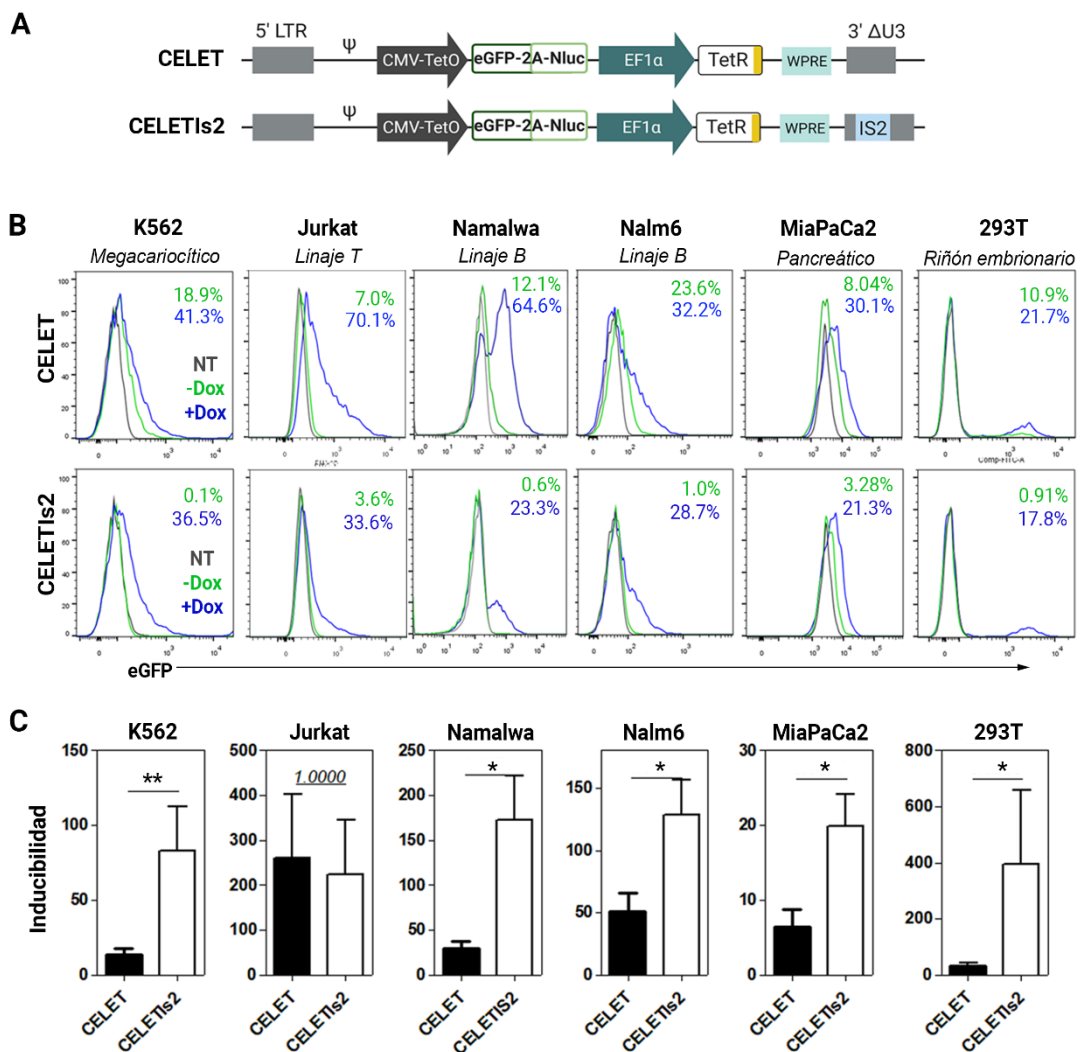


Figura 38. Comportamiento de LV eGFP-NanoLuc Lent-on-plus en líneas celulares *in vitro*. a) Esquema de los VL CELET y CELETIs2 que expresan eGFP-P2A-Nanoluc después de la adición de Dox. B) Histogramas representativos de células K562, Jurkat, Namalwa, Nalm6, MiaPaCa2 y 293T transducidas con CELET y CELETIs2 en ausencia (verde) y presencia de 10 ng/ml de Dox (azul). Las células no transducidas, NT (gris) son utilizadas como control de la expresión de eGFP. C) Gráficos de inducibilidad de las líneas celulares indicadas. Test no paramétrico Man-Whitney, dos colas, * indica $p < 0.05$ y **, $p < 0.01$ (al menos $n = 3$ para cada tipo celular).

5.5 ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DEL CELETIS2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INDUCTOR (DOXICICLINA Y TETRACICLINA).

La sensibilidad a doxiciclina y sus derivados constituye otro factor importante para una futura terapia que emplee estos sistemas inducibles. Por tanto, nos planteamos determinar la mínima cantidad de Doxiciclina y su inductor original, la tetraciclina, necesaria para inducir la expresión del transgén. Así, analizamos células T primarias y las líneas celulares Jurkat, Namalwa y MiaPaCa2 transducidas con el vector CELETIs2 (**Figura 39A**), en presencia de cantidades decrecientes de Dox y Tet durante 72h. Nuestros análisis mostraron que, con tan sólo 0.1 ng/ml de Dox fue suficiente para inducir la expresión de eGFP-2A-Nluc en células T (**Figura 39B**), Jurkat y Namalwa (**Figura 39A**), alcanzando la meseta entre 1-10 ng/ml, mientras que en MiaPaCa2 se requería una dosis un poco más alta (1 ng/ml). Probablemente estas diferencias entre las líneas celulares pueden explicarse con que las células Jurkat y Namalwa eran poblaciones sorteadas positivas para eGFP mientras que sólo un 30% eran MiaPaCa2-CELETIs2+. Sin embargo, este hecho contrasta con la sensibilidad encontrada en células T primarias, donde los análisis de inducibilidad se realizaron con una población mixta ~30% positiva para GFP. También observamos, como era esperable, que se necesitaban dosis hasta 100 veces superiores de tetraciclina (Tet) para conseguir el mismo efecto (**Figura 39A**).

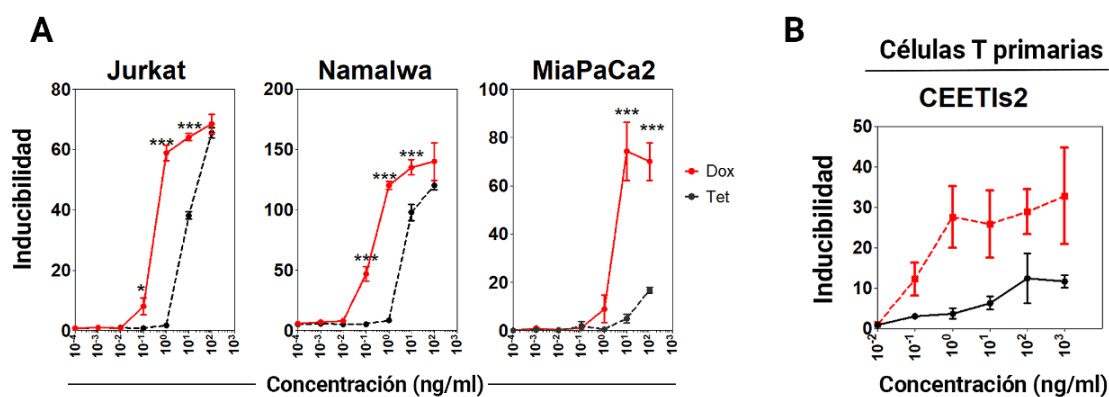


Figura 39. Sensibilidad a los derivados de tetraciclinas del vector CELETIS2 *in vitro*. A) Inducibilidad dependiente de la dosis de Doxiciclina (Dox, rojo) y Tetraciclina (Tet, negro) en células Jurkat, Namalwa (ambas sorteadas) y MiaPaCa2 (~30% GFP+) transducidas con CELETIs2 después de 72 h de adición del

inductor y B) en células T primarias transducidas con los vectores CEETIs2 (~30% GFP+). Jurkat (n=3), Namalwa (n=3), MiaPaCa2 (n=3) y células T (n=3). ***, $p > 0.001$, ANOVA, Bonferroni Post-Test, dos colas.

5.6 ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE PÉRDIDA DE EXPRESIÓN (REVERSIBILIDAD) EN AUSENCIA DE INDUCTOR.

Otro aspecto importante de los sistemas inducibles es la posibilidad de revertir la expresión del GOI una vez se retire el inductor del medio. Se procedió por tanto, a determinar los niveles de expresión de eGFP cada 24 horas después de eliminar el inductor mediante varios lavados con PBS, con el fin de eliminar posibles trazas de Dox en el medio. Tanto en células Jurkat como en Namalwa se pudo observar una pérdida similar de la expresión al retirar la Dox, llegando a niveles sin inductor al cabo de las 96 horas (**Figura 40**). Es importante hacer notar que, en estos experimentos, se está detectando el producto final (eGFP) y que por lo tanto la reversión en ausencia de Dox no se reflejará de manera inmediata, sino que dependerá de dos factores: 1) de lo rápido que se vuelva a acumular el represor TetR para bloquear la expresión del promotor y 2) de la estabilidad de la proteína eGFP.

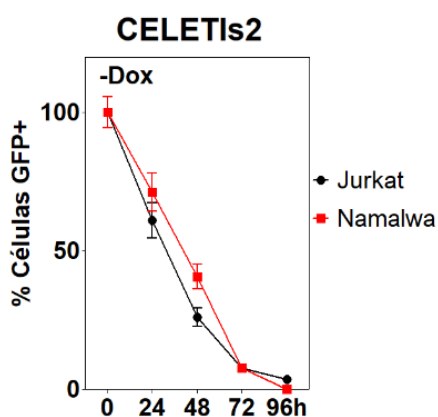


Figura 40. Reversión del sistema LOP-Is2 in vitro. A) Las líneas Jurkat y Namalwa CELETIs2 expresando un 100% de células GFP positivas en presencia de 100 ng/ml, fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar las trazas de Dox en el medio (ver M&M). A continuación, se analizó el porcentaje de expresión de eGFP en ambas líneas cada 24h tal y como se muestra en la gráfica. Los datos representan la media \pm SEM.

5.7 ANÁLISIS DE LA INDUCIBILIDAD DEL SISTEMA LOP-IS2 *IN VIVO*

Una de las aplicaciones potenciales del sistema LOP-Is2 será la generación de células T primarias que sean capaces de responder a concentraciones muy bajas de doxiciclina una vez administradas en los pacientes. Por lo tanto, una vez demostrada la capacidad de estos sistemas de generar células T capaces de responder a dosis muy bajas de Dox (a las cuales no tienen actividad bactericida), procedimos a analizar si estos sistemas eran capaces de mantener la respuesta a Dox en modelos animales, *in vivo*.

5.7.1 Análisis de la inducibilidad *in vivo* del sistema LOP-Is2 expresando eGFP.

En un primer experimento para estudiar el comportamiento *in vivo* de estos vectores LOP, inoculamos de manera intravenosa en ratones NSG una población pura (sorteada) de células Jurkat modificadas con CEET y CEETIs2 (**Figura 41A**) en ausencia de Dox. Seguidamente, indujimos su expresión *in vivo*, utilizando 200 y 1000 µg/ml de Dox disuelta en gelatina, dos veces a la semana (**Figura 41B**). Tras el sacrificio, analizamos la presencia de células CD3+ humanas (hCD3+) en la médula ósea de los ratones (**Figura 41C, abajo**) por citometría de flujo y su expresión de eGFP. Como control, utilizamos células NT y células CEET y CEETIs2 cultivadas *in vitro* (*ex vivo*), cuyos histogramas están representados en gris y rojo, respectivamente. A pesar de lo observado *in vitro* (**Figura 38**), donde ambas líneas celulares responden de manera muy parecida a la Dox, una vez inoculadas en los ratones, solamente el CEETIs2 fue capaz de mantener los niveles bajos de GFP en ausencia de Dox (**Figura 41C, 41D**). Esto parece indicar que, incluso en aquellas líneas donde el LOP tiene una buena inducibilidad *in vitro*, sería conveniente utilizar el LOP-Is2 para evitar problemas de desregulación una vez administradas en los animales. Estos procesos de desregulación se producen a menudo por silenciamiento del/os promotores de los vectores utilizados, por lo que sería interesante investigar cuáles son los procesos que han dado lugar a la pérdida de respuesta a Dox en el caso de las células Jurkat-CEET. Además, si comparamos la intensidad de fluorescencia de las células extraídas de los ratones en presencia de Dox (histogramas azul claro y oscuro), ésta es menor comparada con los valores *ex vivo*, observando cierto silenciamiento con ambos vectores, aunque visualmente menor en el caso de CEETIs2.

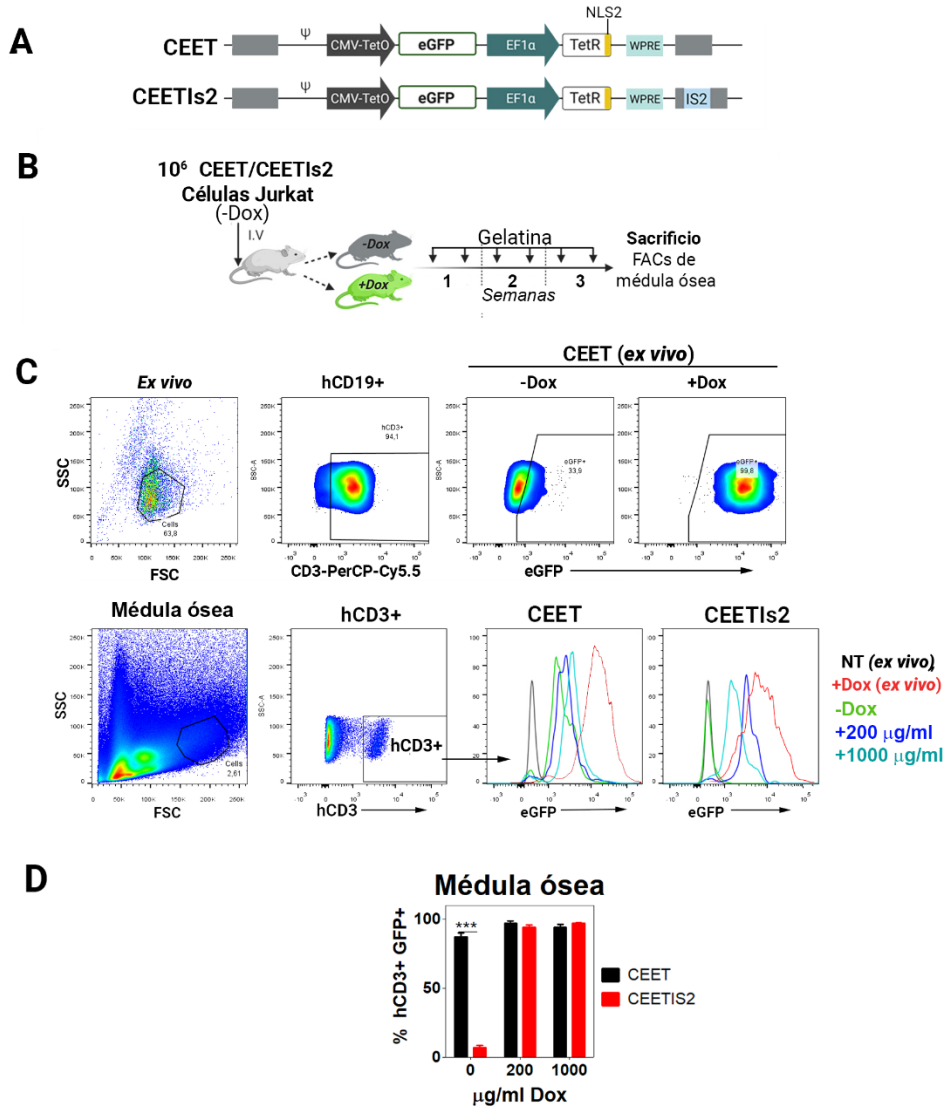


Figura 41. Comportamiento de las células Jurkat-LOP *in vivo*. A) Representación de los VLs CEET y CEETIs2. B) Diagrama experimental de la generación del modelo Jurkat y la evaluación de los VLs. Se administraron dos dosis de doxiciclina disueltas en gelatina dos veces por semana durante 3 semanas. Se sacrificaron los animales y se evaluó la expresión de eGFP en médula ósea mediante FACS. C) Arriba: Dot-plots representativos de la estrategia de análisis utilizando células Jurkat CEET cultivadas *in vitro* (*ex vivo*). Abajo, Izquierda: Dot-plots representativos de la estrategia de selección de células CD3⁺ humanas de la médula ósea de ratones inoculados con células Jurkat. Abajo, derecha: Expresión representativa de eGFP en células Jurkat transducidas con CEET (izquierda) o CEETIs2 (derecha) procedentes de la médula ósea de ratones controles, sin Dox (verde), con 200 µg/ml de Dox (azul oscuro) y con 1000 µg/ml de Dox (azul claro). Se incluye los niveles de expresión de eGFP de células Jurkat control (NT) en ambos plots (NT *ex vivo*, gris, células no-transducidas) y los histogramas de las células CEET y CEETIs2 (+Dox, rojo) como control de la expresión máxima *ex vivo*. D) Gráfica representado el porcentaje de células Jurkat-CEET (barras negras) o Jurkat CEETIs2 (barras rojas) expresando eGFP (hCD3⁺ eGFP⁺ procedentes de la médula ósea de ratones tratados con 0, 200 o 1000 µg/ml de Dox). N = 2 para cada grupo. ANOVA bidireccional, post-test de Bonferroni, ***, indica p < 0,001.

5.8 ANÁLISIS DE LA INDUCIBILIDAD *IN VIVO* DEL SISTEMA LOPIS2 EXPRESANDO EGFP-2A-NLUC.

Las líneas celulares Namalwa, Jurkat y MiaPaCa2 expresan eGFP-2A-Nluc a través de los vectores CELET y CELETIS2 (**Figura 38A**) fueron inoculados en ratones NSGs, lo que nos permite observar mediante bioluminiscencia (con analizador IVIS) la inducción *in vivo* de la Nanoluciferasa (**Figura 42A**). En primer lugar, nos centramos en la línea Namalwa por la rapidez de la generación de los tumores en la facilidad de manipulación. De la misma manera que en el modelo anterior, la Dox se administró *ad libitum* disuelta en gelatina. A día 12 post-inoculación de las células Namalwa, realizamos el ensayo en el IVIS (**Figura 42A**), observando que 1 µg/ml de Dox era suficiente para observar señal luminiscente y, al igual que en todos los análisis anteriores, el vector inducible con aislador CELETIS2 mantenía mejor los niveles de *leaking* comparado con el vector que carecía de aislador CELET (**Figura 42B**).

El experimento estaba diseñado para poder analizar la reversión del proceso de inducción, desafortunadamente, los animales necesitaron de punto final humanitario a día 16 por la agresividad del modelo, por lo que no pudimos realizar un IVIS para estudiar la reversión por bioluminiscencia. A pesar de ello, procesamos la médula ósea de los diferentes grupos de ratones y analizamos la expresión de eGFP en las células humanas Namalwa CD19+ (**Figuras 42C, 42D**), los cuales llevaban cuatro días sin ingerir Dox. Así, podríamos tener una idea aproximada de la reversión por citometría de flujo (**Figura 42C, abajo**, mostrando una expresión del 30% de la población CD19 humana seleccionada), si lo comparamos con el porcentaje de células GFP+ CELET y CELETIS2 *ex vivo*, cercano al 100% (**Figura 42C, arriba**). Como puede observarse en la **Figura 42D**, tanto el CELET, como el CELETIS2 muestran una clara pérdida de la expresión al retirar Dox (tanto en los ratones tratados con 10 como con 1 µg/ml), aunque esta bajada en los niveles de eGFP fue mucho más evidente con el vector con el aislador (CELETIS2).

Además, nos planteamos evaluar la sensibilidad del sistema LOP-Is2 (CELETIS2) *in vivo* (**Figuras 42D, 42E**) en diferentes modelos. En primeras aproximaciones utilizando un modelo de tumor subcutáneo con células MiaPaCa2, observamos su regulación con al menos 1 µg/ml de Dox (**Figura 42D**). A continuación, decidimos bajar la dosis hasta 10 ng/ml, y de este modo, detectamos bioluminiscencia dada por la Nanoluc con tan sólo 10 ng/ml de Dox en gelatina en el modelo de células Namalwa (**Figura 42E**), corroborando la alta sensibilidad del sistema también *in vivo*.

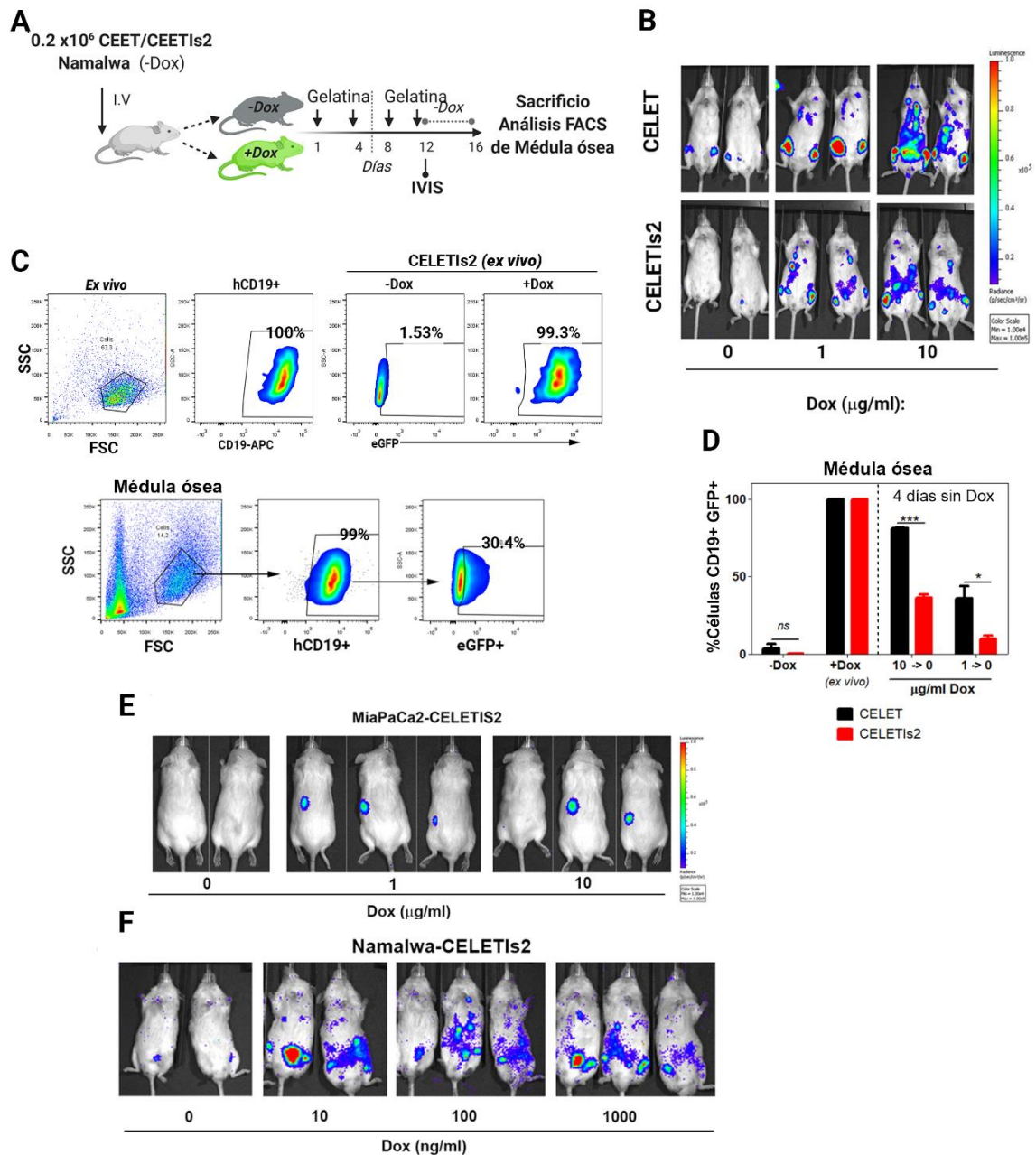


Figura 42. Análisis de inducibilidad del sistema LOP y LOP-Is2 *in vivo*. A) Esquema de generación del modelo de Namalwa y cronograma del experimento. B) Imágenes de bioluminiscencia de los ratones inoculados con células de Namalwa transducidas con CELET y CELETIs2 el día 12 después de la inoculación y tratados con 0, 1 o 10 µg/ml de Dox en gelatina. C) Arriba: Dot-Plots representativos de las células CELETIs2 cultivadas *ex vivo* y su estrategia de selección al utilizadas como control para determinar el máximo de expresión GFP+ de la población sorteada que fue inoculada. Abajo: Estrategia de selección de las células Namalwa infiltradas en médula ósea de los ratones como células hCD19+ y dentro de esta región, se determina la expresión de eGFP+, utilizando como control la estrategia del panel superior. D) Porcentaje de células hCD19+eGFP+ en la médula ósea de los ratones sacrificados después de 4 días tras eliminar la Dox de su dieta (10-> 0 y 1-> 0 µg/ml) y ratones que nunca han sido provistos de Dox. Se utilizaron células Namalwa CELET y CELETIs2 *in vitro*, como control del porcentaje máximo de

expresión. ANOVA bidireccional, post-test de Bonferroni. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Bioluminiscencia dependiente de la dosis de Dox de ratones inoculados con células D) MiaPaCa2-CELETIS2 y E) CELETIS2-Namalwa.

5.9 EL SISTEMA LENTONPLUS-IS2 ES UN SISTEMA VERSÁTIL QUE PERMITE LA REGULACIÓN DE GRANDES TRANSGENES: GENERACIÓN DE CÉLULAS CAR-T INDUCIBLES (ICAR-T)

A continuación, nos planteamos sustituir el transgén de interés, hasta ahora GFP o GFP-NanoLuc, para evaluar la versatilidad del sistema LOP-Is2 a uno de mayor tamaño con relevancia funcional. Para ello, generamos un vector CAR inducible como prueba de concepto (**Figura 43A**). En este caso, utilizamos un CAR frente a CD19 de tercera generación (con dominios intracelulares CD28, 41BB y CD3z) junto a un EGFR truncado (tEGFR, sin dominios intracelulares de señalización), el cual es utilizado en clínica como un elemento de seguridad ya que las células CAR+ pueden ser rápidamente deplecionadas con el anticuerpo monoclonal Cetuximab.

5.9.1 Determinación de la inducibilidad del vector LOPIs2-CAR

Tras su generación, se procedió a analizar el comportamiento de los vectores LOPIs2-CAR en células Jurkat, células K562 (**Figura 43**) y en células T primarias (**Figura 44**). Para ello, los diferentes tipos celulares fueron transducidos con 40 μ l (Jurkat y K562) o 100 μ l (células T) del vector LOPIs2-CAR concentrado 10 veces para generar células Jurkat-iCARIs2, K562-iCARIs2 y células T- iCARIs2. A pesar de su elevado tamaño (2.8kb), el vector LOPIs2-CAR (**Figura 43A**) fue capaz de regular de manera muy estricta la expresión del CAR-2A-tEGFR sólo en presencia de Dox en todas las células, incluyendo, las células T primarias (**Figura 44**), con ausencia total de expresión en todas ellas cuando no hay inductor.

Esto se puede observar en los análisis de citometría frente a tEGFR, donde los niveles de expresión de las células control NT (**Figura 43B**, plots de la izquierda) y el de las Jurkat-iCARIs2, K562-iCARIs2 (**Figura 43B**, plots centrales) son idénticos. Sólo en presencia de inductor podemos detectar tEGFR con una buena eficacia (**Figura 43B**, Plots de la derecha) en todas estas líneas inducibles.

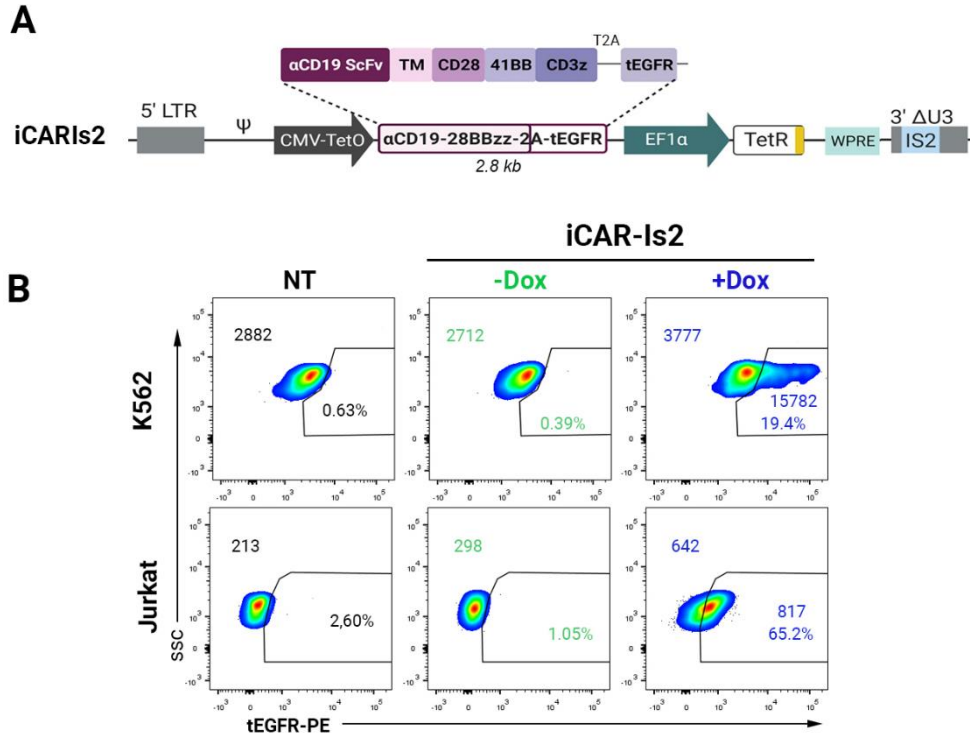


Figura 43. El sistema LOP-Is2 es una herramienta versátil para el control de la expresión de un CAR de tercera generación en líneas celulares. D) Esquema representativo del VL Lent-on-Plus iCARIs2 que codifica un CAR de una tercera generación antiCD19 (α CD19-CD28-41BB-CD3z) con un sitio T2A y el EGFR truncado (EGFRt) como marcador. E) Dot-Plots representativos de la expresión de EGFRt en células K562 y Jurkat transducidas con iCARIs2-VLs en ausencia o presencia de 10 ng/ml de Dox.

Análogamente en células T primarias (**Figura 44**), corroboramos los resultados obtenidos con el gen reportero donde comparábamos los sistemas LOP en presencia y ausencia de aislador, pero en el contexto del vector CAR (**Figura 44A**). Así, tal y como esperábamos, el vector iCAR-Is2 fue capaz de regular el transgén en presencia de Dox con mínima expresión en ausencia de ésta (**Figura 44B, 44C**) respecto a las células no transducidas (plots de la izquierda, **Figura 44B**).

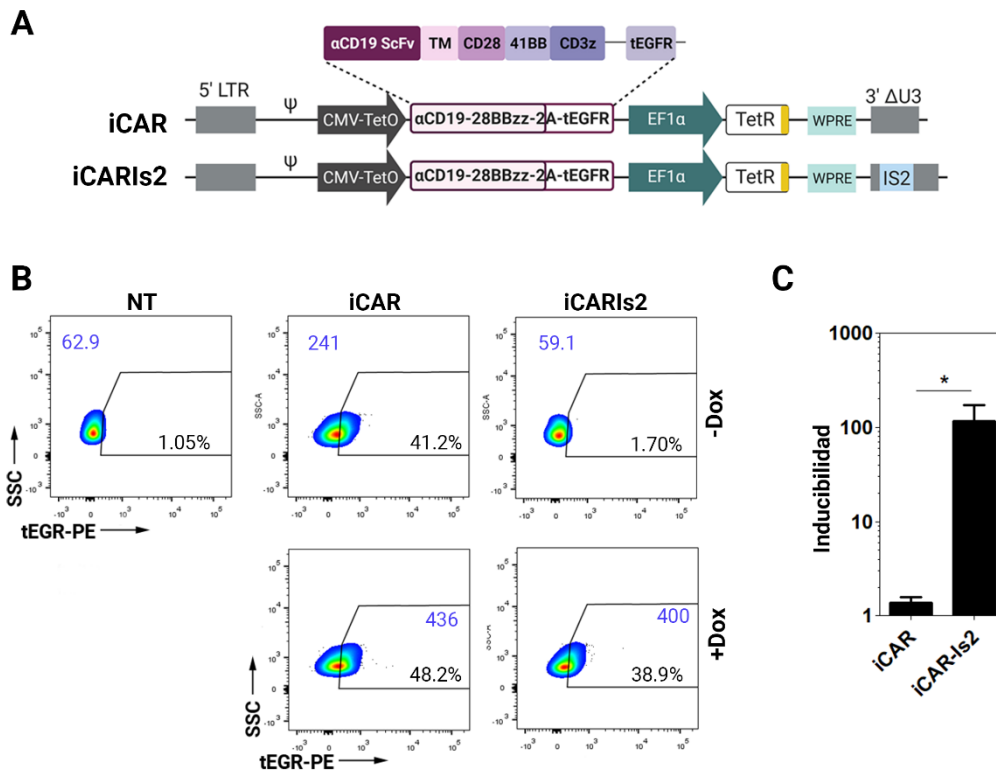


Figura 44. Inducibilidad del iCAR-Is2 en células T primarias. A) Esquema de los VL*iCAR* e *iCARIs2* que codifican para un CAR antiCD19-CD28-41BB-CD3z de tercera generación con un péptido T2A y EGFR truncado como marcador de selección. B) Dot-plots de la expresión de *iCAR* (1c/c) e *iCARIs2* (0.8 c/c) en células T primarias en condiciones -Dox y +Dox (10 ng/ml) después de 10 días después de la transducción. Las células no transducidas (NT) se utilizan como control negativo de la expresión (tEGFR). Los valores de MeFI de la población total (izquierda) o dentro de la región CAR/tEGR + (derecha) se indican en color azul. C) Inducibilidad de la expresión de *iCAR* e *iCARIs2* en células T primarias. T-Test de Man-Whitney, * indica $p < 0.05$ ($n = 4$).

5.9.2 Determinación de la dependencia de Dox de las células T-*iCAR* para eliminar sus células diana (CD19+)

A continuación, queríamos estudiar, por un lado, si las células T-*iCAR* eran funcionales, es decir, si se expresaban suficientes niveles de CAR en la superficie de las células T, como para que esta fuese capaz de eliminar las células diana CD19+ y, por otro lado, hasta qué punto esto ocurría exclusivamente en presencia de Dox. Para ello se procedió a determinar el grado de lisis específica de las células diana CD19+ (Nalm6 y Namalwa) y de células CD19- (K562) en presencia o ausencia de Dox. Los resultados en estos ensayos de citotoxicidad mostraron que las células T-*iCARIs2* sólo lisaban las células CD19+ (Nalm6 y Namalwa) en presencia de Dox (**Figura 45**), demostrando así que esta regulación es funcional. Aunque la eficacia de lisis no fue igual que con los vectores constitutivos, como puede observarse por la presencia de células

CD19+ a las 48 horas del encuentro.

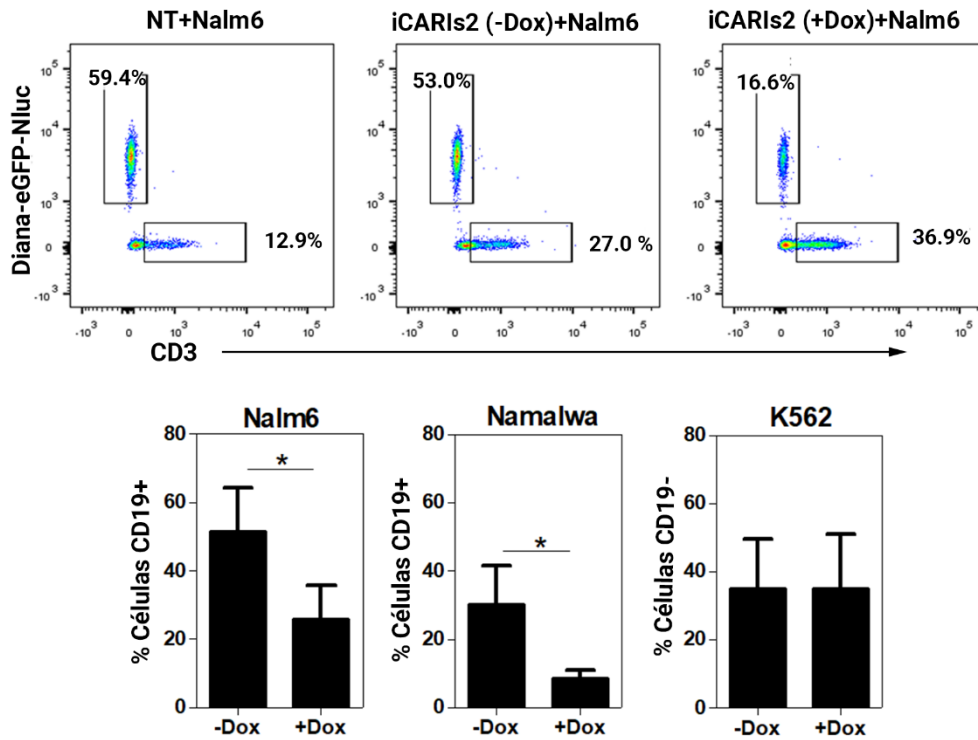


Figura 45. Las células T iCAR-Is2 exhiben lisis celular CD19 + específica solo en presencia de Dox. Arriba Dot-Plots representativos del ensayo de citotoxicidad de las células T no transducidas NT, iCARIs2 (-Dox) e iCARIs2 (+Dox), cultivadas en una proporción de células diana 1: 1: células CAR-T con células Nalm6-eGFP-Nluc + durante 48 h. Abajo: Porcentaje de células CD19 + (Nalm6 y Namalwa) y células CD19- (K562) en ausencia o presencia de Dox en el ensayo de citotoxicidad. *indica $p < 0.05$. Test de datos pareados no paramétricos Wilcoxon, * indica $p < 0.05$ (n = 4).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La terapia con células CAR-T α CD19 han logrado impresionantes beneficios terapéuticos en las neoplasias linfoides del linaje B refractarias/recidivantes (R/R), lo que ha llevado a la aprobación de Kymriah, Yescarta, Tecartus, Breynzi y ARI-0001 y a más de 800 ensayos clínicos en todo el mundo. La mayoría de estos estudios han utilizado células T autólogas que son genéticamente modificadas por vectores basados en retrovirus para expresar el CAR a través de un promotor fuerte (a menudo los promotores EF1 α o MSCV). Sin embargo, la inmunoterapia con células CAR-T todavía tiene limitaciones importantes debido a los efectos secundarios graves y la falta de respuestas completas duraderas en el 40-62% de los linfomas CD19+ y la mayoría de los tumores sólidos.

Existen a día de hoy, un amplio abanico de estrategias que pretenden optimizar la composición del producto de infusión, así como mejoras en la arquitectura de la proteína CAR (cambiando scFV, dominios bisagra/espaciador, dominios coestimuladores, CAR bi-específicos o multi-específicos, etc) y en combinación con otras terapias que han contribuido a mejorar esas respuestas. Dentro de estos nuevos enfoques, podemos encontrar aproximaciones para mejorar la eficacia y/o seguridad de CAR-T a través del control de la actividad de dicha célula CAR-T y otras moléculas bioactivas y/o de mecanismos para evitar reacciones inmunológicas contra las células CAR-T.

En la presente Tesis nos planteamos contribuir al progreso de las estrategias actuales de inmunoterapia, especialmente en el ámbito de la terapia CAR-T hacia una versión más eficaz, segura y regulada. En particular, nos hemos centrado en optimizar una de las herramientas de modificación genética más utilizadas para su generación: los vectores lentivirales. Nuestra visión va en la línea de que dicha expresión debe ser regulada, bien controlada por factores endógenos (que dependa del estado de activación de la célula T) o bien, externamente, en una aproximación donde dicho control es inducido por la doxiciclina. De este modo, nos sumamos a la evidencia de que la expresión continua y constitutiva del CAR no es una situación óptima, y de hecho, limita muchas de las aplicaciones de la terapia CAR-T.

Por lo tanto, a lo largo de esta Tesis hemos desarrollado dos estrategias diferentes y complementarias que buscan mejorar la potencia y seguridad de las células CAR-T mediante el control de la expresión. Por un lado, se han desarrollado los vectores lentivirales AW controlados de forma endógena, que mimetizan el patrón de expresión del TCR tras la activación de las células T, mejorando el fenotipo y la eficacia de las células α CD19 CAR-T. Por otro lado, hemos demostrado la capacidad de los vectores lentivirales LOP para controlar la expresión de cualquier

GOI en las células T, lo que ha permitido generar células CAR-T inducibles en ausencia de transactivador y respondiendo a dosis mínimas de doxiciclina. Todos estos abordajes se han analizado en diferentes modelos celulares CD19+ y CD19- generados durante la realización de esta tesis y que han permitido realizar todos los estudios de eficacia y seguridad tanto *in vitro* como *in vivo*.

MODELOS TUMORALES CD19+

El primer paso para poder alcanzar los objetivos de la Tesis, era generar modelos tumorales que nos permitieran su monitorización *in vitro e in vivo* y determinar la citotoxicidad de las células CAR-T. Está ampliamente extendido el uso de test basados en la liberación de cromo radiactivo, luciferasa o cambios en la impedancia para determinar la lisis de las células CAR-T *in vitro* (Kiesgen *et al.*, 2021).

Con la intención de mejorar la terapia CAR-T frente a linfomas de linaje B, que es aún una de las necesidades clínicas no cubiertas, decidimos desarrollar este modelo en células Namalwa, procedentes de un linfoma de Burkitt, uno de los más agresivos, además del modelo con células Nalm6, de leucemia linfoblástica aguda. Para ello, decidimos diseñar un VL que expresara GFP y una nueva luciferasa de bajo peso molecular (19kDa) con alta penetrancia y alta estabilidad, llamada NanoLuc (England, Ehlerding and Cai, 2016). Esta NanoLuc ha sido optimizada a partir de la luciferasa procedente de *Oplophorus gracilis*, utilizando así furimazina como sustrato el cual convierte en furimamida y emite luz con una emisión máxima en la región azul (450-485 nm) del espectro visible.

La modificación de las células Nalm6 y Namalwa con este vector nos ha permitido evaluar la citotoxicidad *in vitro* mediante citometría de flujo, además de poder caracterizar fenotípicamente a las células T-CAR tras el contacto con las células tumorales. Por otro lado, este vector ha resultado tener un excelente comportamiento *in vivo*, aportando un fondo residual mínimo, a pesar de realizar las adquisiciones en el IVIS *Spectrum* con campo abierto (sin utilizar filtro) y durante 3 minutos tanto en el modelo con Namalwa presentado en la actual tesis como en modelos orto-tópicos de adenocarcinoma pancreático *in vivo* generados con esta construcción (Navarro-Marchal *et al.*, 2021). Hasta donde sabemos, es el único modelo utilizando estas células de manera sistémica como modelo de linfoma para la evaluación preclínica CAR-T, si bien otros grupos han desarrollado modelos animales de ratones NSG con células Daudi-Fluc o NSG-Raji-Fluc también derivadas de linfoma de Burkitt con características muy similares de progresión tumoral.

Por otro lado, hemos generado un primer modelo artificial de carcinoma pancreático a partir de la línea MiaPaCa2 expresando CD19+ y GFP-Nluc, para poder ser diana de las células

α CD19-CAR-T que hemos desarrollado aquí y a su vez, poder monitorizarlas. El cáncer pancreático se considera un tumor frío de carácter metastásico, de bajo infiltrado celular, con una pobre respuesta a la terapia con CAR-T, por lo que indican la presencia de diferentes mecanismos inhibitorios y, por tanto, un ambiente más arduo que favorece el agotamiento para evaluar la persistencia de nuestros vectores. Las células MiaPaCA2 están mutadas para p53, p16, KRAS, con una población de células cancerosas troncales, alta capacidad de migración e invasión tumoral (Deer *et al.*, 2010) y baja expresión de HLA-A2 y han sido utilizadas en diversos estudios de modelos de aplicación de células CAR-T para la generación de un tumor ortotópico en ratones NSG (Yazdanifar *et al.*, 2019).

A pesar de haber sorteado una población pura, hemos observado una pérdida de CD19 en la superficie, de modo que los experimentos fueron llevados en presencia de una población tumoral heterogénea para la diana, lo cual podría ser interesante al asemejarse un poco más a la situación real de un tumor sólido, donde uno de los mecanismos de resistencia regula a la baja el antígeno diana.

Hay que destacar que, a pesar de la relevancia de los ensayos de lisis tumoral con los modelos xenogénicos utilizando ratones NSG, estos modelos presentan una clara desventaja experimental como consecuencia realizarse en ratones inmunodeficientes y carecer de inmunidad adaptativa, por lo que no van a reflejar perfectamente la complejidad de la enfermedad.

REGULACIÓN FISIOLÓGICA PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS CAR-T.

En contra de lo que se hipotetizó en un principio con la terapia CAR-T, donde se buscaba una alta expresión del CAR, diversos trabajos demuestran que esos niveles altos y continuos de la expresión del CAR en superficie pueden ser deletéreo para la eficacia y seguridad de los productos CAR-T. Una de las causas de pérdida de eficacia proviene del agotamiento temprano y apoptosis inducida por activación (AICD), causado por un exceso de señalización tras el encuentro con el antígeno tumoral. Esta señalización fuerte genera a su vez una rápida producción de citoquinas proinflamatorias (CRS), y que, en algunos casos, ha resultado ser incontrolable y causado la muerte de los pacientes.

Esa alta densidad de CAR en superficie permite la formación de *clusters* que, en ausencia de antígeno, pueden reclutar con más facilidad las quinasas encargadas de iniciar la activación, y con ello, exhibir una señalización tónica, que no sólo va agotando a la célula CAR-T de manera basal, si no que puede producir citoquinas proinflamatorias tóxicas en ausencia de células tumorales.

Considerando lo anterior, queda latente la necesidad de cambiar la estrategia de expresión del CAR en superficie: ni insuficiente que genere anergia, ni una expresión alta continua que deriva en una activación crónica y a la larga, ineficiente. Así, Eyquem *et al.* (2017) demuestran por primera vez que cuando el CAR se expresa bajo el promotor endógeno TCR de la célula T utilizando herramientas de edición genómica, el nuevo producto exhibe una menor señalización tónica, una reducción del agotamiento y una mayor proporción de células T_{SCM}/T_{CM} CAR-T, lo que en definitiva resultó en una mejor actividad antitumoral. Estos autores también demostraron que una baja expresión no era suficiente para lograr productos CAR-T óptimos, concluyendo que se requería una regulación a la baja del CAR tras el encuentro con el antígeno para un rendimiento óptimo del CAR-T.

Sin embargo, las herramientas de edición genómica, aunque son muy prometedoras y desde hace unos años están iniciándose en la clínica (Sachdeva *et al.*, 2019; McGowan *et al.*, 2020; Pavlovic *et al.*, 2020; Martínez Bedoya, Dutoit and Migliorini, 2021), todavía se tienen que definir mejor los posibles efectos secundarios debido a modificaciones indeseadas en el genoma (Martin *et al.*, 2016; Qasim *et al.*, 2017; Turchiano *et al.*, 2021) y grandes deleciones que están ocasionando dichas nucleasas. Además del difícil y costoso escalado, se requiere una caracterización exhaustiva desde un punto de vista de seguridad, con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas, por lo que aún están lejos de su asentamiento en clínica.

En esta línea nos planteamos desarrollar una estrategia que permitiera la expresión fisiológica del CAR, pero utilizando vectores lentivirales, los cuales han sido ya aprobados por la FDA y la EMA para su uso en clínica como medicamentos de terapias avanzadas.

Dado que las regiones reguladoras responsables de la actividad del promotor del TRAC en linfocitos T humanos no están definidas, se procedió a investigar el patrón de expresión de diferentes VLs disponibles en el laboratorio. Se puso especial foco en aquellos que contenían promotores relacionados con la actividad aguas abajo del TCR por su potencial regulación conjunta. Es por ello que nos centramos en el promotor basado en el gen WAS, cuya proteína sólo se expresa en linaje hematopoyético y que al participar en la formación de la sinapsis inmunológica como adaptador en la transducción de señales tras la activación de la célula T, hipotetizamos que podría regularse a nivel transcripcional además de a nivel de fosforilación como está descrito (Cotta-de-Almeida *et al.*, 2015). Además, habíamos desarrollado diferentes promotores quiméricos basados en el locus WAS, los cuales tienen fragmentos de los promotores proximal y alternativo de su promotor original y que habían resultado eficientes y excelentes candidatos para expresar transgenes en las células hematopoyéticas (Martín *et al.*, 2005; Frecha *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2020).

Así, observamos que el promotor WAS (AW-VL) expresando GFP mimetizaba parcialmente la bajada observada en el patrón del TCR, con un pequeño descenso, recuperándose hasta niveles basales a los 5-7 días. Sin embargo, cuando el mismo vector regula la expresión del CAR, esta bajada fue total a las 24h, mimetizando perfectamente el patrón CD3/TCR, muy probablemente debido a que la proteína CAR es más sensible a la degradación/reciclaje que GFP, la cual es bastante estable.

A continuación, investigamos si el hecho de presentar este perfil de expresión tras activación, se traducía en una mejor funcionalidad. Para ello, comparamos las células 4-1BB-CAR-T generadas con este VL-de expresión fisiológica (AWARI) versus al ARI-0001, generado con un VL que expresa el CAR bajo el promotor EF1 α .

En los modelos de células CD19+ de origen linfocítico de tipo B (Nalm6 y Namalwa), no pudimos detectar diferencias significativas con las células ARI en términos de actividad antitumoral *in vitro* o *in vivo*, aunque las células AWARI exhibieron una señalización tónica más baja y un fenotipo menos diferenciado después de la eliminación eficiente de las células CD19+. Además también se observó una secreción reducida de citocinas proinflamatorias suficientes para ejercer la misma actividad antitumoral, lo que podría suponer una cierta mejora en la seguridad de estas células CAR-T. Esa disminución sin que afecte a su capacidad citotóxica queda apoyada por los resultados con el promotor MND, el cual genera también una densidad menor de CAR en superficie y el cual está actualmente en un ensayo clínico, donde los pacientes tratados desarrollaron menos fiebre y menos IFN γ comparado con el CAR-expresado bajo EF1 α , sugiriendo *a priori*, un mejor perfil de seguridad, aunque habrá que esperar a los resultados de eficacia y a largo plazo (NCT03840317, Ho *et al.*, 2021)

La mejora en el fenotipo y el agotamiento coinciden en gran parte con las observaciones de Eyquem *et al.* 2017 donde expresan el CAR a través del locus endógeno TRAC. Sin embargo, estos autores también mostraron una mejor actividad antitumoral *in vivo*. Las diferencias en el modelo tumoral de ratones (ellos utilizan Nalm-6 *versus* nuestro modelo con Namalwa) así como un dominio de señalización CAR diferentes (CD28 *versus* 4-1BB) y otro scFv (clon FMC63 *versus* clon A3B1) podrían explicar las diferencias observadas.

De hecho, los posibles efectos deletéreos de la sobreexpresión de CAR y la señalización tónica están muy influenciados por la configuración de CAR. Es el caso del trabajo de Long y colaboradores, donde demostraron que el dominio coestimulador 4-1BB vs el CD28, revertía el agotamiento en las células T con CAR y mejoraba su persistencia y eficacia terapéutica. Esto corroboraría también el buen comportamiento de las células ARI que hemos observado en nuestros experimentos.

Desafortunadamente, nuestro modelo *in vivo* presentaba una importante limitación experimental y es que los ratones que no presentaron dispersión tumoral, sufrieron de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) causada por la administración de células CAR-T, lo que podría explicar la ausencia de una mayor eficacia terapéutica esperada, por la necesidad de análisis a más largo plazo y/o con más inoculaciones de las células tumorales.

A pesar de las buenas características de las células 4-1BB-CARs, las cuales presentan ese fenotipo más indiferenciado, con menor agotamiento y señalización tónica, Gomes-Silva y colaboradores (2017) demostraron que niveles muy altos de expresión de 4-1BB-CARs también conducen a apoptosis, a AICD y limitan la expansión de las células CAR-T. Cabe destacar que, aunque 4-1BB se induce tras la activación en células T, es también miembro de la familia de receptores de TNF, los cuales participan directamente en la señalización de la muerte celular.

Por otro lado, se ha observado que cuando se utilizan scFv que normalmente no son propensos a agruparse (como es el caso del clon FMC63 scFv, típico de los CARs comerciales y muy probablemente también del vector ARI-0001), el uso de un dominio coestimulador 4-1BB puede conferir una señalización tónica 4-1BB independiente del ligando que parece requerir la activación de células T (mediada por unión de CD3 y CD28) (Ajina and Maher, 2018)

Gomes-Silva y colaboradores también demostraron que la reducción de sus niveles de expresión mediante el uso de EF1 α -VL en lugar de un vector γ -retroviral, cuya expresión está determinada por el LTR, aún más fuerte que el promotor EF1 α , mejora el fenotipo, el potencial de expansión y la eficacia terapéutica. Estos estudios mostraron que los VLs cuyo transgén se expresa bajo el promotor EF1 α ya generan un buen producto CAR para algunos 4-1BB-CAR.

Aun así, hemos demostrado que en este contexto de vector lentiviral y CAR-4-1BB, expresar el CAR de manera controlada, con ese patrón de reposo tras la estimulación mimetizando al TCR, puede mejorar aún más sus características, al menos, con el CAR ARI-0001 en particular (el cual posee un ScFv diferente a los CAR comerciales, Castella *et al.*, 2019).

Por otro lado, la densidad de superficie del antígeno diana puede afectar la fuerza de respuesta de las células CAR. Así una menor densidad de antígeno de superficie resultó en una menor producción de citocinas por las células CAR-T (Nishida *et al.*, 2021), demostrando en este estudio por primera vez en un CAR-T anti-CD20-CD28zz, que el umbral de densidad de superficie del antígeno requerido para la producción de citocinas era 10 veces mayor que la densidad requerida para la actividad lítica.

Así pues, para una adecuada terapia en cuanto a seguridad y eficacia frente a una diana concreta, deben considerarse múltiples parámetros desde la densidad y accesibilidad del antígeno

tumoral en la superficie de la célula diana, como la afinidad y avidéz del ScFv de la célula CAR-T, en un delicado balance donde su actividad puede controlarse a través de la expresión.

De este modo, en un contexto diferente, alterar uno de estos aspectos, como el promotor, y, por tanto, la densidad de CAR en superficie puede resultar exitoso sin tener que modificar la arquitectura del CAR.

Las ventajas de expresar el CAR a través del promotor AW han quedado reflejadas en modelo artificial de carcinoma pancreático que sobreexpresa CD19 humano en la superficie, siendo ahora diana de nuestras células CAR-T. En este panorama, las células AWARI resultaron ser más eficientes en la lisis específica tras tres encuentros con una población heterogénea de células MiaPaca2, donde menos del 50% habían dejado de expresar la diana terapéutica. Es interesante también mencionar que el parámetro de lisis específica considera también la muerte inespecífica (células CD19- control) en presencia y ausencia del CAR, en un balance de potencia citotóxica/seguridad. Así, observamos que las células AWARI solían presentar menos muerte inespecífica que las ARI, probablemente por tener menor señalización tónica en ausencia del antígeno.

Otros aspectos de vital importancia en la actual terapia CAR-T, están relacionados con los posibles efectos secundarios debidos a la sobreestimulación y/o estimulación inadecuada. EL CRS grave (grados 3 o 4) se ha observado con relativa frecuencia en las terapias frente a CD19, lo que no sólo compromete la efectividad de la terapia al tener que intervenir prematuramente para parar/frenar la terapia, si no que puede afectar muy severamente al paciente, comprometiendo incluso su vida. Esta tormenta de citoquinas y síndrome de activación macrofágica pueden depender de una alta carga tumoral y de una alta expresión del CAR en superficie de la célula T. Al encontrarse con las células tumorales, las células CAR-T liberan diferentes citoquinas proinflamatorias como TNF α , IFN γ , IL-1 y GM-CSF que conducen al reclutamiento y activación de macrófagos causando una peligrosa tormenta de citocinas que involucra a IL-6 y GM-CSF (Stern *et al.*, 2019; Yáñez, Sánchez-Escamilla and Perales, 2019; Morris *et al.*, 2021).

También se ha demostrado que la activación de macrófagos contacto-dependiente a través de CD40L/CD40, CD69, LAG-3/MHC-II y TNF α en membrana también contribuye a esa activación masiva (Wagner *et al.*, 2021). Aunque el CRS se puede manejar con corticosteroides y anti-IL6R (Tocilizumab), estas intervenciones también bloquean la activación de las células T comprometiendo la eficacia de CAR-T. Aquí hemos demostrado que las células CAR-T generadas con AW-LV exhiben una secreción más leve de TNF α e IFN γ después del encuentro con las células tumorales. Además, notamos que la expresión de LAG-3 se redujo después de la interacción de Namalwa, lo que sugiere que las células AW-CAR-T podrían reducir el riesgo de CRS.

Con la intención de poder explicar estas diferencias, analizamos los potenciales sitios de unión de transcripción en las secuencias de los promotores EF1 α y AW. Estas predicciones indicaron que ambos promotores tenían la capacidad de responder ante estímulos proinflamatorios, citoquinas y estrés a través de diferentes factores y rutas.

Aunque ambos promotores pueden teóricamente responder ante diferentes estímulos proinflamatorios y estrés derivado del microambiente tumoral, un elemento diferenciador que explique el patrón de expresión observado con los vectores reporteros derivados del promotor AW, puede ser la presencia de un sitio de FOXP3. Este factor de transcripción ampliamente caracterizado en las células T reguladoras, está también presente en las células T convencionales de manera transiente tras la activación del TCR sin que les afecte a la producción de citoquinas o les haga virar hacia un fenotipo antiinflamatorio Th2 pero que sí parece actuar como un freno, un regulador negativo en la secreción de citoquinas como IL-2 e IFN γ , una de las citoquinas que hemos analizado en este proyecto, como han demostrado McMurchy y colaboradores (McMurchy *et al.*, 2013).

En cualquier caso, sería interesante poder evaluar la seguridad de este vector en un modelo humanizado de ratón, donde las células humanas CAR-T puedan activar y reclutar a los macrófagos humanos y determinar los niveles de citoquinas proinflamatorias, de manera análoga a lo que sucede tras la infusión de las células CAR-T en humanos. Sin embargo, estos modelos son extremadamente complejos que requiere de un injerto previo con progenitores hematopoyéticos humanos en los ratones NSGs, y una vez reconstituido el sistema inmunitario, inocular las células tumorales y posteriormente, las células T primarias modificadas del mismo donante.

Por último, con la intención de caracterizar el producto basalmente, a los 10 días post-activación, que es más o menos el tiempo de la manufactura del producto en clínica, determinamos los niveles de PD1, LAG3 y Tim3 como marcadores de agotamiento, y pCD3z como indicador de señalización tónica, los cuales fueron significativamente menores en el caso de AWARI. También analizamos la expresión de Fas en las células CAR-T, con la intención de caracterizar una mayor predisposición a la AICD. Esta expresión resultó ser significativamente más baja en las AWARI-CAR-T respecto a las ARI en ausencia de estímulo. Sin embargo, se incrementó de manera similar tras la lisis de Namalwa y en también, pero en menor medida y casi significativo, en el modelo de las MiaPaCa2, probablemente por tener menor expresión de CD19+ (población mixta CD19+/CD19-) o al no señalar vía TCR al carecer de MHC-clase II (en concreto las células T de los donantes usados en estos experimentos presentaban un porcentaje mayoritario de células CD4+) como podría ocurrir con las células Namalwa sumado a la baja expresión de HLA-2A de estas células (Chen *et al.*, 2017)

Las AWARI-CAR-T podrían en este caso, minimizar la AICD, dado que FasL se induce tras activación fuerte en la célula T, y uniéndose a Fas, el cual se expresa de manera constitutiva en éstas, desencadenarían la apoptosis inducida por activación (Arakaki *et al.*, 2014b). Por otro lado, esta menor expresión podría también minimizar una apoptosis inicial comparada con las ARI-CAR-T tras infiltrarse en algunos tipos de tumor sólido y su TME que sobreexpresan FasL habitualmente (Chappell and Restifo, 1998), aunque finalmente, se activarían las rutas apoptóticas.

Todas estas observaciones abren la puerta a una caracterización futura de muchos otros marcadores de activación implicados en la AICD o agotamiento, como FasL, CD40L entre otros, así como en determinar los niveles de secreción de otras citoquinas como GM-CSF, que puedan seguir sumando valor al uso de un promotor que, con un patrón de expresión regulada similar al TCR, es suficiente para ejercer una acción citotóxica y mejorar el producto CAR-T actual.

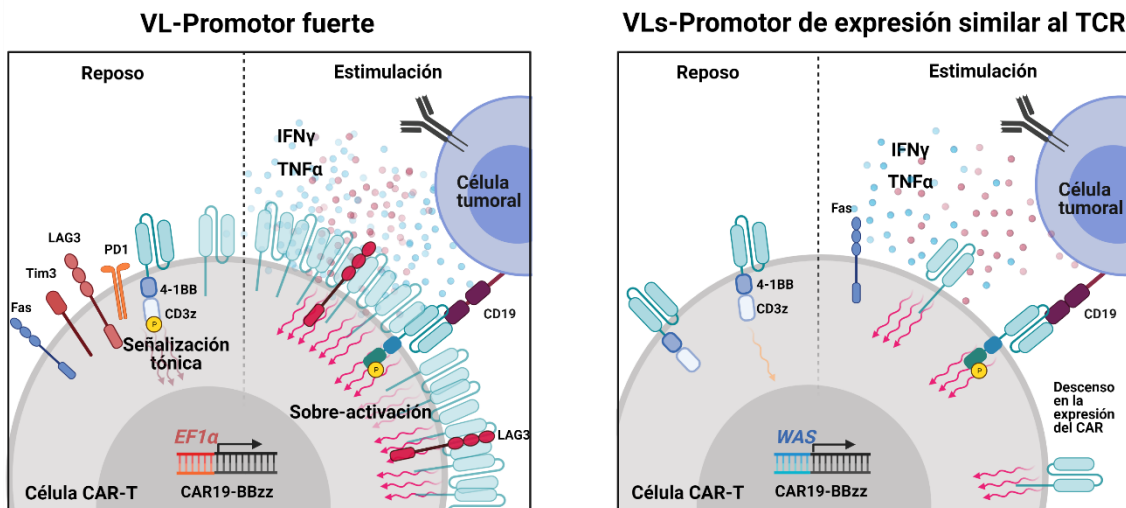


Figura 46. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la regulación de la expresión del CAR a través de los promotores EF1a y WAS. Las células CAR-T producidas con VLs con promotores constitutivos fuertes tienen una mayor actividad tónica en estado de reposo, comparados con células CAR-T generadas con VLs-AW (Promotor de expresión similar al TCR, panel de la derecha en reposo). Tras activación, la concentración del CAR en superficie de la célula T se incrementa en los CAR-T convencionales (Estimulación, panel de la izquierda), al contrario de lo que ocurre cuando utilizamos nuestros VLs fisiológicos. En resumen las células CAR-T que expresan el CAR a través del promotor AW, presentaron menor señalización basal, menor secreción de citoquinas proinflamatorias, un fenotipo más troncal memoria y un menor agotamiento.

REGULACIÓN EXTERNA: SISTEMAS INDUCIBLES PARA INCREMENTAR LAS POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS DE LAS CÉLULAS CAR-T

La idea de este objetivo era también mejorar las células CAR-T a través del control de la expresión, pero ahora desarrollando sistemas que permitan al clínico controlar cuando se debe de expresar el gen de interés (GOI). Para ello se necesitaban de sistemas inducibles por un fármaco ampliamente utilizado como es la doxiciclina, capaces de regular diferentes GOIs de manera exógena. La idea final es generar una plataforma que permita al clínico controlar la expresión de moléculas de relevancia terapéutica y altamente bioactivas (citoquinas, interferones, metaloproteasas, selectinas). De esta manera, se podrá incrementar la funcionalidad de la célula CAR-T tras la administración de doxiciclina y volver a su estado inicial tras su retirada. Esta tecnología podría ayudar a mejorar los resultados de las células CAR-T para el tratamiento de aquellos tumores (especialmente sólidos o linfomas) que aún no se han visto beneficiados de la terapia CAR-T.

Como se ha mencionado previamente, el éxito de las terapias CAR-T se ha centrado en los tumores hematológicos porque la efectividad frente a tumores sólidos ha resultado muy escasa, por lo que existe la necesidad de nuevos enfoques, con una mayor potencia que permita convertir en un verdadero campo de batalla ese microambiente tumoral.

En esta línea queda todavía mucho por hacer, y las herramientas de expresión génica controladas exógenamente pueden resultar muy interesantes. Actualmente, la cuarta generación de células CAR-T, los TRUCKS, coexpresan el CAR junto con citoquinas (IL-12, IL-18, IL-15) y/o en combinación con ICIs como PD-1 o CTLA-4 de una manera constitutiva.

El hecho de poder controlar la expresión de diferentes moléculas de relevancia terapéutica como puede ser el CAR, pero también proteínas tóxicas, citoquinas, inhibidores de punto de control o metaloproteasas de manera externa con un inductor inocuo, extiende todo un abanico hacia nuevas inmunoterapias más eficaces y seguras.

Por un lado, hemos visto que regular la expresión del CAR de forma endógena ayuda a reducir el CRS, los efectos fuera de la diana (*off-target*) y el agotamiento, y esto se aplicaría de igual manera al controlar de una manera fina, la expresión de moléculas tan potentes como son la IL-12 o IL-18, mejorando así el producto CAR-T frente a tumores sólidos y evitando los devastadores efectos secundarios de la expresión continua en los pacientes.

Actualmente existen diversos trabajos que co-expresan el CAR junto a la citoquina bajo un promotor sensible a la activación de las células T, como es el NFAT-IL-2 (Chmielewski and Abken, 2020), que, si bien no se expresa a través de un promotor constitutivo, podría activarse por cualquier otro estímulo (como una infección) y sin ser el abordaje más óptimo.

Así, nuestro objetivo pretende generar una plataforma que permita la expresión controlada exógenamente, en nuestro caso por doxiciclina como fármaco ampliamente aceptado, con la regulación más estricta y precisa posible con la intención de minimizar posibles efectos secundarios fuera del tumor. Debe de ser, además, versátil, de aplicación a cualquier tipo celular del sistema inmunitario y que permita una fácil *ingeniería* para cambiar la molécula potenciadora.

En primer lugar, estudiamos el comportamiento de dos sistemas inducibles por doxiciclina desarrollados por el grupo (LOP y CEST), basados en el TetR original, en células T primarias, como miembros clave de la inmunoterapia. Uno de los principales atractivos de estos sistemas es que funcionan en ausencia de transactivadores (quimeras TetR-VP16), por lo que *a priori*, van a ser más seguros que los sistemas que los requieren como son los vectores desarrollados por las compañías de Takara, Sangon Biotech o Clontech y más aceptados para su inclusión en clínica. Estos transactivadores, por definición, reclutan factores de transcripción, pudiendo alterar la fisiología celular de manera no controlada.

Tanto el sistema LOP como el CEST, son vectores lentivirales todo-en-uno, es decir, contienen tanto un casete de expresión del regulador (TetR) como el casete regulable (CMVTetO-eGFP) en un sólo vector. Esta configuración facilita la modificación genética estable de las células de interés, mientras que otros sistemas duales (dos vectores) tienen que realizar una selección con antibióticos o bien, esperar un rendimiento aún menor.

Nuestros resultados mostraron que únicamente los sistemas LOP bloqueaban casi totalmente la expresión del transgén reportero en ausencia de Dox, mientras que los sistemas CEST, si bien regulaban la expresión de eGFP, exhibían un *leaking* cercano al 100%. Por lo tanto los sistemas LOP se alzaron como potenciales candidatos para su aplicación a células T inmortalizadas. Sin embargo, estos sistemas requerían de la presencia del aislador Is2, para controlar la expresión en las células T primarias, resaltando una vez más, la importancia del contexto celular y la diferencia entre los modelos celulares y las células primarias.

Además, y en la misma línea, el Is2 mejoró también el comportamiento del vector LOP *in vivo*, incluso en células Jurkat, donde los estudios *in vitro* no habían detectado ninguna diferencia en regulación entre el LOP y el LOPIS2. Esto sugiere que sería oportuno utilizar el LOP-Is2 *in vivo* para evitar procesos de desregulación ocasionados por el silenciamiento del/os promotores de los vectores utilizados. Sería interesante estudiar los mecanismos que han dado lugar a la pérdida de respuesta en el caso de las células Jurkat-CEET tras su paso por los ratones en ausencia de Dox.

Los aisladores, como el sitio hipersensible 4 de pollo (cHS4) son capaces de blindar a los vectores integrados dentro del genoma de hospedador para favorecer su expresión, evitando el

silenciamiento. Los elementos de unión a la matriz SARs/sMARS también han sido influidos en los vectores retrovirales para mejorar la expresión del transgén y evitar la inactivación del promotor, principalmente por su capacidad para unirse a ciertos factores de transcripción. El aislador Is2, también sintetizado por nuestro grupo, combina un fragmento de 650bp del elemento HS4 junto a un elemento SAR sintético (Benabdellah *et al* 2014), y demostrado mejorar la eficiencia de expresión de VLs en células humanas embrionarias y en la actividad transcripcional de IDLVs (VLs deficientes en integrasa, no integrativos) en células pluripotentes y neuronales (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Este elemento Is2 se encuentra localizado dentro del 3' LTR del esqueleto lentiviral, lo cual permite, debido al proceso de retrotranscripción e integración dentro del genoma, que nuestro casete de expresión se quedaría flanqueado por dos Is2 a ambos lados del LTR, evitando así que tanto el vector afecte al contexto genómico donde se ha integrado y viceversa. Desafortunadamente, el hecho de incluir el Is2 en un sitio arquitectónicamente importante para el VL, afecta dramáticamente a su título viral. Es por ello que nos planteamos evaluar su efecto y el de otros elementos aisladores fuera del 3' LTR, cuya configuración una vez integrado, sólo presentará un elemento aislador en el extremo 5'.

De este modo, corroboramos que eliminar el LTR del 3'LTR incrementaba los títulos virales, y que cada vector LOP con los diferentes aisladores se comportaba de manera diferente según el tipo celular. Los nuevos vectores presentaron una tendencia a mejorar la inducibilidad en células Jurkat, mientras que tuvieron un efecto negativo en células Nalm6, Namalwa y especialmente en células T primarias, ya que no fueron capaces de mantener bajos niveles de *leaking* en ausencia de Dox, un criterio clave para la estrategia de inmunoterapia que proponemos.

Considerando lo anterior, llegamos a la conclusión de que el casete de expresión del LOP debe estar flanqueado por dos elementos Is2 una vez integrado en el cromosoma de la célula diana para conseguir una regulación eficiente.

El inductor y sus características constituyen otro parámetro clave para los beneficios de la terapia. La doxiciclina es un antibiótico derivado de las tetraciclinas, con un pequeño tamaño y de carácter polar que le permite ser permeable a la barrera hematoencefálica.

Nos sorprendió la alta sensibilidad de nuestro vector LOP-Is2 tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo entre 10-100 veces más sensible que los sistemas descritos hasta el momento (Tristán-Manzano *et al.*, 2020), capaz de responder a dosis tan bajas como 0.1 ng/ml *in vitro* y 10 ng/ml *in vivo*.

Los vectores TetOn que se han utilizado para inducir la expresión del CAR, requerían dosis *in vitro* que variaban desde 100ng/ml hasta 4g/ml de Dox, superponiéndose con las dosis

requeridas como antibiótico y, por lo tanto, son susceptibles de generar resistencia en caso de exposición prolongada o intermitente. Además, se ha observado que concentraciones sub-inhedorias del crecimiento bacteriano (150 ng/ml), son capaces de inducir resistencia y que puede favorecerse en ambientes estresantes (Chait *et al.*, 2016), como puede ser el tumoral, por lo cual, intentar utilizar la menor dosis posible minimizaría dicho riesgo para una futura terapia.

Otro factor importante en un vector inducible es su capacidad de reversión. En nuestro caso, tanto *in vitro* como *in vivo*, la reversión total ocurría entre las 72-96h, especialmente con el vector que contiene el Is2. Por un lado, la doxiciclina tiene una vida media en el ser humano de 20h, siendo muy estable también en cultivo. Esto, sumado a la alta sensibilidad del sistema, capaz de inducirse con trazas presentes en el medio, podría explicar ese tiempo en llegar a niveles basales.

Por último, como prueba de concepto, nos plantemos generar un CAR inducible por Dox para evaluar el comportamiento del vector con un transgén significativamente de mayor tamaño y que nos permitiera controlar la actividad de la célula T. Así, generamos células T primarias, con un 20-40% de transducción y una expresión baja del CAR en superficie, con capacidad de lisar células CD19+, tanto de LLA como de linfoma, únicamente en presencia de Dox.

En un principio, estas células iCAR pueden constituir una herramienta más válida que los otros vectores TetOn, ya que, a pesar de la baja expresión obtenida, han sido capaces de lisar las células tumorales y hacerlo sólo en presencia de Dox. Además, tienen la ventaja de carecer de transactivadores y una sensibilidad a doxiciclina que permite utilizar dosis muy por debajo de su actividad microbicida. El control de la expresión del CAR permitiría hacer ciclos ON/OFF para hacer reposar a la célula T, como realizan Weber y colaboradores (2020) con otra estrategia inducible, podría ejercer los mismos beneficios en cuanto al agotamiento y diferenciación, mejorando así la eficacia terapéutica.

A pesar de las posibles aplicaciones de las células iCARs generadas en esta Tesis, existen otras alternativas mucho más avanzadas e interesantes para controlar la expresión del CAR de manera inducible *in vivo* (específicas para el CAR), como son los sistemas inducibles por rapamicina (Leung *et al.*, 2019). Y es por ello que nuestro objetivo en esta tesis ha sido demostrar la versatilidad de nuestro sistema para poder regular cualquier transgén, especialmente importante para esas moléculas bioactivas tóxicas, y que sea compatible con otras estrategias. Por ejemplo, se podría expresar el CAR con los VLs AW y citocinas como IL-12 con los vectores lentivirales LOPIs2.

Utilizar transgenes más pequeños, como pueden ser citoquinas o interferones, favorecería la generación de mayores títulos virales con el sistema LOPIs2. Desafortunadamente, hasta el momento, los títulos obtenidos han constituido una limitación técnica que nos ha dificultado la

progresión hacia el modelo animal con células T primarias. Esperamos explorar próximamente la generación de mejores títulos virales en aquellos LOPIs2 expresando proteínas más pequeñas como IL-18. Se prevé también utilizar diferentes potenciadores para mejorar la transducción de las células T primarias.

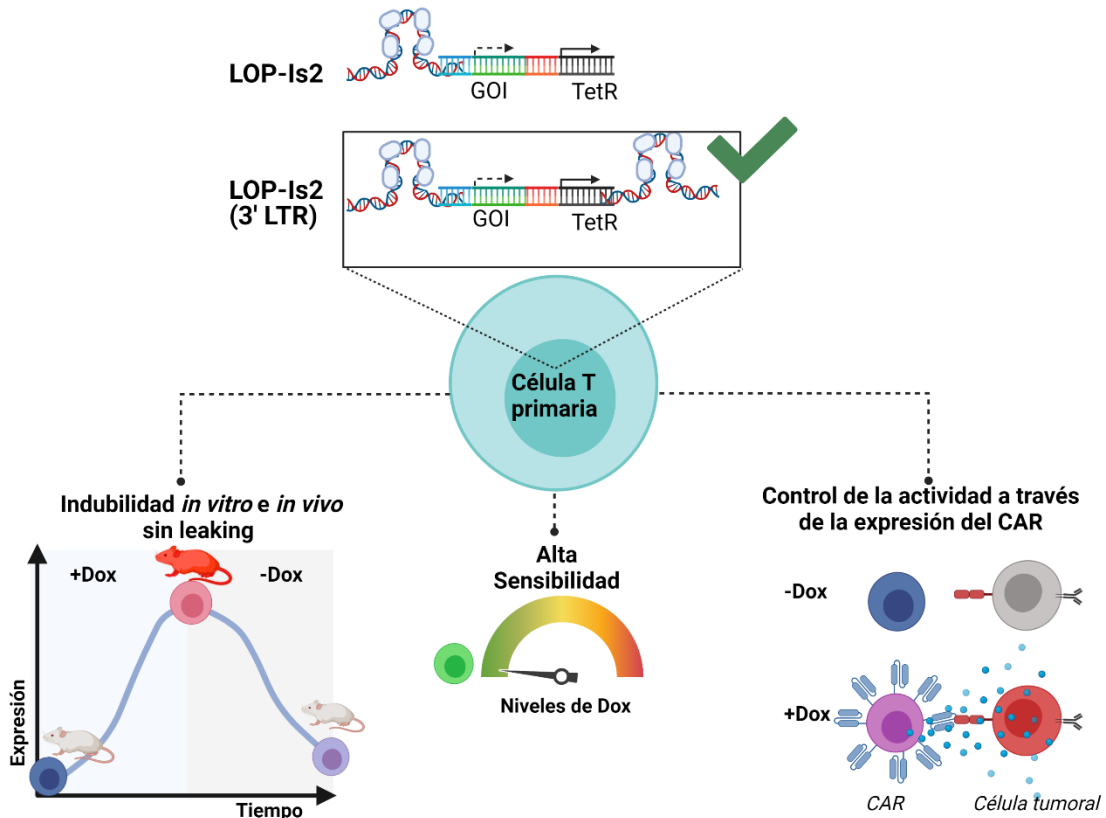


Figura 47. La configuración del Is2 dentro del 3'LTR es la única configuración posible para la regulación inducible en células T primaria. Este vector LOP-Is2 demostró una buena inducibilidad *in vitro* e *in vivo*, con alta sensibilidad y capaz de regular la actividad de las células CAR-T en presencia de Dox.

PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA EN CONDICIONES SIMILARES A GMP

Finalmente, investigamos la viabilidad de generar un producto de células CAR-T viable para su translación a clínica utilizando el vector AWARI. Para ello, utilizamos un biorreactor cerrado y semiautomatizados que pueden reducir el tiempo de intervención y estandarizar la producción de células T con CAR de grado clínico, como es CliniMACS Prodigy de Miltenyi, aunque existen en el mercado otras plataformas (Roddie *et al.*, 2019). Una de las ventajas del CliniMACs es que puede ser utilizado en una sala no necesariamente blanca, ya que, al ser un sistema cerrado, mantiene el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) y es también accesible a instituciones académicas y hospitales. También se puede adaptar a las

necesidades de muestras individuales, ofrece monitoreo de muestras, permite la entrega de células no congeladas y rápidamente produce un producto funcional en menos de 2 semanas (Jackson *et al.*, 2020)

Con la intención de poder validar en un futuro nuestro producto CAR-T, realizamos dos producciones en este biorreactor localizado en la Unidad d Terapia Celular del Hospital Reina Sofía, demostrando la factibilidad de generar células CAR-T AWARI), con alta viabilidad celular, poblaciones predominantes TSCM y TCM y una potente actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, en condiciones similares a GMP, ya que si bien, todos los productos y reactivos fueron de esta calidad, los vectores lentivirales fueron producidos en el laboratorio.

Comparando nuestros resultados obtenidos aquí, y en los estudios comparativos ARI y AWARI Castella y colaboradores analizaron el fenotipo de 28 lotes de ARI-CAR-T a partir de aféresis de pacientes y donantes sanos, demostrando que ARI-0001 generó más poblaciones memoria y población de memoria efectora durante el proceso de fabricación (Castella *et al.*, 2020).

Por otro lado, en nuestros dos lotes, obtuvimos una población mayoritariamente CD4, como también se ha observado en otros centros (Castella *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2020) con condiciones de producción muy similares a las nuestras en el CliniMACs Prodigy.

Respecto a la eficacia de la transducción, fue menor en comparación con ARI (~18,4% frente a ~30,6%). Sin embargo, ambas producciones fueron suficientes cubrir obtener múltiples dosis por paciente estándar, las cuales han sido establecidas como 1×10^6 células CAR-T/kg de peso del paciente con LLA y LLC, y 5×10^6 células CAR-T/kg para pacientes con linfoma no-Hodgkin.

Aunque es cierto que hemos usado aféresis de donante sano, estas eficacias de expansión pueden verse claramente reducidas cuando el material de partida proceda de un paciente refractario, por lo que un mayor porcentaje de transducción permitiría expandir menos *ex vivo* estos productos al alcanzar el número de células CAR+ suficiente y evitar comprometer la potencia antitumoral del producto. En esta línea, una optimización futura en el esqueleto AWARI VL podría mejorar aún más el proceso de fabricación de las células AW-CAR-T.

Así, las características intrínsecas del promotor AW, con menor señalización tónica y menor agotamiento de manera basal comparado con producto ARI, a los 10 días post-activación, que es, aproximadamente el tiempo de producción, le hacen ser un buen candidato para mejorar la calidad del producto antes de la infusión. Y es por ello, que proponemos el uso de AW-VL como una plataforma alternativa para la fabricación de células CAR-T con el fin de proporcionar

mejor eficacia y/o seguridad, si bien los potenciales beneficios finales de expresar diferentes CAR a través del promotor de AW deberán determinarse en cada caso.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los modelos tumorales que expresan CD19 y GFP-Nanoluciferasa permiten evaluar la citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. El promotor WAS-AW es capaz de regular de manera fisiológica la expresión del transgén mimetizando el comportamiento natural del TCR tras una estimulación antigénica en células T primarias.
3. Ese patrón de expresión fisiológica hace que las células AW-CAR-T presenten mejores características funcionales que las células EF1 α -CAR-T en términos de diferenciación, agotamiento y eficacia con una menor densidad de CAR en superficie y un perfil de secreción de citoquinas proinflamatorias más moderado.
4. Las células AW-CAR-T pueden ser manufacturadas a gran escala en el biorreactor CliniMACs Prodigy en condiciones similares a GMP manteniendo su funcionalidad y fenotipo *memoria*.
5. Los vectores lentivirales LOP son capaces de generar células T inducibles por doxiciclina con muy bajo *leaking*, buena sensibilidad, permitiendo controlar la actividad de las células CAR-T de manera externa.
6. El aislador Is2 incluido en el 3'LTR del vector LOPIs2 es necesario para regular en células T primarias.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, Lichtman and Pillai (2018) *Cellular and Molecular Immunology - 9th Edition*. 9th edn. ELSEVIER. Available at: <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3> (Accessed: 22 June 2021).
- AEMPS (2017) *Informe de Posicionamiento Terapéutico de blinatumomab (Blinicyto®) en leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Philadelphia negativo en situación de refractariedad o en recaída*.
- AEMPS IPT4/2020 (2020) *Informe de Posicionamiento Terapéutico de venetoclax*.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios-Kymriah (2018) *FICHA TECNICA KYMRIAH 1,2 x 10e6 - 6,0 x 10e8 células dispersion para perfusion, 2020*. Available at: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1181297001/FT_1181297001.html (Accessed: 27 June 2021).
- Ajina, A. and Maher, J. (2018) 'Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling', *Molecular Cancer Therapeutics*. American Association for Cancer Research Inc., pp. 1795–1815. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1097.
- Amirache, F. *et al.* (2014) 'Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor', *Blood*. American Society of Hematology, pp. 1422–1424. doi: 10.1182/blood-2013-11-540641.
- Anagnostou, T. and Ansell, S. M. (2020) 'Immunomodulators in Lymphoma', *Current Treatment Options in Oncology*. Springer, 21(4). doi: 10.1007/s11864-020-0720-8.
- Anderson, N. R. *et al.* (2020) 'Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy'. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2990.
- Arakaki, R. *et al.* (2014) 'Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression', *Critical Reviews in Immunology*. Begell House Inc., 34(4), pp. 301–314. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2014009988.
- Aranda, F. *et al.* (2019) 'The Intriguing History of Cancer Immunotherapy', *Frontiers in Immunology* / www.frontiersin.org, 10, p. 2965. doi: 10.3389/fimmu.2019.02965.
- Arcangeli, S. *et al.* (2017) 'Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia', *Molecular Therapy*. American Society of Gene and Cell Therapy, 25(8), pp. 1933–1945. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.04.017.
- Bai, R. *et al.* (2020a) 'Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., p. 1290. doi: 10.3389/fonc.2020.01290.
- Barrett, J. A. *et al.* (2018) 'Regulated intratumoral expression of IL-12 using a RheoSwitch Therapeutic System® (RTS®) gene switch as gene therapy for the treatment of glioma', *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 25(5–6), pp. 106–116. doi: 10.1038/s41417-018-0019-0.
- Benabdellah, K. *et al.* (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*. PLoS One, 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0023734.
- Benabdellah, K. *et al.* (2014) 'A chimeric HS4-SAR insulator (IS2) that prevents silencing and enhances expression of lentiviral vectors in pluripotent stem cells', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(1), p. 84268. doi: 10.1371/journal.pone.0084268.
- Benabdellah, K. *et al.* (2016) 'Lent-On-Plus Lentiviral vectors for conditional expression in human stem cells', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep37289.
- Benmeharek, M.-R. *et al.* (2019) 'Molecular Sciences Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells'. doi: 10.3390/ijms20061283.
- Berraondo, P. *et al.* (2019) 'Cytokines in clinical cancer immunotherapy', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 6–15. doi: 10.1038/s41416-018-0328-y.

- Bersenev, A. (2017) 'CAR-T cell manufacturing: time to put it in gear', *Transfusion*. Blackwell Publishing Inc., pp. 1104–1106. doi: 10.1111/trf.14110.
- Bowers, J. S. *et al.* (2017) 'PI3K δ inhibition enhances the antitumor fitness of adoptively transferred CD8+ T cells', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 8(SEP), p. 1221. doi: 10.3389/fimmu.2017.01221.
- Boyiadzis, M. *et al.* (2017) 'Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia', *Cytotherapy*. Elsevier B.V., 19(10), pp. 1225–1232. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.07.008.
- Braendstrup, P., Levine, B. L. and Ruella, M. (2020) 'The long road to the first FDA-approved gene therapy: chimeric antigen receptor T cells targeting CD19', *Cytotherapy*. Elsevier B.V., pp. 57–69. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.12.004.
- Brandt, L. J. B. *et al.* (2020) 'Emerging Approaches for Regulation and Control of CAR T Cells: A Mini Review', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 326. doi: 10.3389/fimmu.2020.00326.
- Brentjens, R. J. *et al.* (2013) 'CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia', *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, 5(177), pp. 177ra38-177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930.
- Cai, C. *et al.* (2020) 'A comprehensive analysis of the fatal toxic effects associated with CD19 CAR-T cell therapy', *Aging*. Impact Journals LLC, 12(18), pp. 18741–18753. doi: 10.18632/aging.104058.
- Carlson, R. D. *et al.* (no date) 'toxins Talkin' Toxins: From Coley's to Modern Cancer Immunotherapy'. doi: 10.3390/toxins12040241.
- Castella, M. *et al.* (2019) 'Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions', *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 12, pp. 134–144. doi: 10.1016/j.omtm.2018.11.010.
- Castella, M. *et al.* (2020) 'Point-of-care CAR T-cell production (ARI-0001) using a closed semi-automatic bioreactor: Experience from an academic phase I clinical trial', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 11, p. 482. doi: 10.3389/fimmu.2020.00482.
- Chait, R. *et al.* (2016) 'Pervasive selection for and against antibiotic resistance in inhomogeneous multistress environments', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/ncomms10333.
- Chappell, D. B. and Restifo, N. P. (1998) 'T cell-tumor cell: A fatal interaction?', *Cancer Immunology Immunotherapy*. NIH Public Access, pp. 65–71. doi: 10.1007/s002620050505.
- Chen, L. and Flies, D. B. (2013) 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, pp. 227–242. doi: 10.1038/nri3405.
- Chen, Y. *et al.* (2017) 'Cancer Therapy: Preclinical Ex Vivo PD-L1/PD-1 Pathway Blockade Reverses Dysfunction of Circulating CEA-Specific T Cells in Pancreatic Cancer Patients'. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1185.
- Chien, C. H. *et al.* (2009) 'Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human T cells', *Human Reproduction*. Oxford University Press, 24(8), pp. 1968–1975. doi: 10.1093/humrep/dep099.
- Chmielewski, M. *et al.* (2011) 'IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 71(17), pp. 5697–5706. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0103.
- Chmielewski, M. and Abken, H. (2020) 'TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation', *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY*. Wiley, 3(3), p. e84. doi: 10.1002/acg2.84.
- Cho, J. H., Collins, J. J. and Wong, W. W. (2018) 'Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses', *Cell*. Cell Press, 173(6), pp. 1426-1438.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.038.

- Choi, J. and Lee, S. Y. (2020) 'Clinical characteristics and treatment of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors', *Immune Network*. Korean Association of Immunologists. doi: 10.4110/in.2020.20.e9.
- Cotta-de-Almeida, V. *et al.* (2015) 'Signal integration during T lymphocyte activation and function: Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 47. doi: 10.3389/fimmu.2015.00047.
- Curtsinger, J. M. and Mescher, M. F. (2010) 'Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation', *Current Opinion in Immunology*. Curr Opin Immunol, pp. 333–340. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.013.
- D'Souza, C., Prince, H. M. and Neeson, P. J. (2021) 'Understanding the Role of T-Cells in the Antimyeloma Effect of Immunomodulatory Drugs', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 632399. doi: 10.3389/fimmu.2021.632399.
- DeAngelo, D. J. (2015) 'The use of novel monoclonal antibodies in the treatment of acute lymphoblastic leukemia', *Hematology (United States)*. Bulgarian Medical Society of Hematology, 2015(1), pp. 400–405. doi: 10.1182/asheducation-2015.1.400.
- Deer, E. L. *et al.* (2010) 'Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines', *Pancreas*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 425–435. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
- Depil, S. *et al.* (2020) "'Off-the-shelf" allogeneic CAR T cells: development and challenges', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Research, pp. 185–199. doi: 10.1038/s41573-019-0051-2.
- Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D. and Rock, K. L. (2021) 'Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568.
- Dong, S. and Ghobrial, I. M. (2019a) 'Immunotherapy for hematological malignancies', *JoLS, Journal of Life Sciences*. JoLS, Journal of Life Sciences, 1(1), p. 46. doi: 10.36069/jols/20190605.
- Dong, S. and Ghobrial, I. M. (2019b) 'Immunotherapy for hematological malignancies', *JoLS, Journal of Life Sciences*. JoLS, Journal of Life Sciences, 1(1), p. 46. doi: 10.36069/jols/20190605.
- Drent, E. *et al.* (2018) 'Feasibility of controlling CD38-CAR T cell activity with a Tet-on inducible CAR design', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 13(5), p. e0197349. doi: 10.1371/journal.pone.0197349.
- Dunn, G. P. *et al.* (2002) *Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape*. Available at: <http://www.nature.com/natureimmunology> (Accessed: 19 June 2021).
- Einsele, H. *et al.* (2020) 'The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types', *Cancer*. John Wiley and Sons Inc., pp. 3192–3201. doi: 10.1002/cncr.32909.
- Ellis, G. I., Sheppard, N. C. and Riley, J. L. (no date) 'Genetic engineering of T cells for immunotherapy', *Nature Reviews Genetics*. doi: 10.1038/s41576-021-00329-9.
- England, C. G., Ehlerding, E. B. and Cai, W. (2016) 'NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence', *Bioconjugate Chemistry*. American Chemical Society, pp. 1175–1187. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00112.
- Eshhar, Z. *et al.* (1993) 'Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 90(2), pp. 720–724. doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
- Eyquem, J. *et al.* (2017) 'Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection', *Nature*. Nature Publishing Group, 543(7643), pp. 113–117. doi: 10.1038/nature21405.
- FitzGerald, T. J. *et al.* (2019) 'Radiation therapy', in *Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery*. Wiley, pp. 447–461. doi: 10.1002/9781119645214.ch24.
- Fraietta, J. A. *et al.* (2018) 'Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 558(7709), pp. 307–312. doi: 10.1038/s41586-018-0178-z.

- Frecha, C. *et al.* (2008) 'Improved lentiviral vectors for Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy mimic endogenous expression profiles throughout haematopoiesis', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 15(12), pp. 930–941. doi: 10.1038/gt.2008.20.
- Frigault, M. J. *et al.* (2015) 'Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells', *Cancer Immunology Research*. American Association for Cancer Research Inc., 3(4), pp. 356–367. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0186.
- Fujiwara, K. *et al.* (2020) 'Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 527(2), pp. 350–357. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.071.
- Gao, J. *et al.* (2016) 'Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy', *Cell*. Cell Press, 167(2), pp. 397–404.e9. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.069.
- Garbi, N. *et al.* (2010) 'Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Current Trends, pp. 601–608. doi: 10.1016/j.coi.2010.08.007.
- Gardner, R. *et al.* (2016) 'Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy', *Blood*. American Society of Hematology, 127(20), pp. 2406–2410. doi: 10.1182/blood-2015-08-665547.
- Gargett, T. and Brown, M. P. (2015) 'Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2', *Cytotherapy*. Elsevier Inc., 17(4), pp. 487–495. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.12.002.
- Gattinoni, L. *et al.* (2005) 'Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells', *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 202(7), pp. 907–912. doi: 10.1084/jem.20050732.
- Gattinoni, L. *et al.* (2006) 'Adoptive immunotherapy for cancer: Building on success', *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access, pp. 383–393. doi: 10.1038/nri1842.
- Gattinoni, L. *et al.* (2011) 'A human memory T cell subset with stem cell-like properties', *Nature Medicine*. NIH Public Access, 17(10), pp. 1290–1297. doi: 10.1038/nm.2446.
- Gisselbrecht, C. and Van Den Neste, E. (2018) 'How I manage patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma', *British Journal of Haematology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 633–643. doi: 10.1111/bjh.15412.
- Global-T-Cell-Therapy-Market-2021 (no date) *Global T-Cell (CAR-T, TCR, and TIL) Therapy Market (5th Edition) | Industry Analysis | Market Size | 2030*. Available at: https://www.rootsanalysis.com/reports/view_document/t-cell-therapies-market/261.html (Accessed: 27 June 2021).
- Golubovskaya, V. and Wu, L. (2016) 'Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy', *Cancers*. MDPI AG. doi: 10.3390/cancers8030036.
- Gomes-Silva, D. *et al.* (2017) 'Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent', *Cell Reports*. Elsevier B.V., 21(1), pp. 17–26. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.015.
- Gross, G., Waks, T. and Eshhar, Z. (1989) 'Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 86(24), pp. 10024–10028. doi: 10.1073/pnas.86.24.10024.
- Gu, X. *et al.* (2018) 'Development of inducible cd19-car t cells with a tet-on system for controlled activity and enhanced clinical safety', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 19(11). doi: 10.3390/ijms19113455.
- Guallar-Garrido, S. and Julián, E. (2020) '<p>Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update</p>', *ImmunoTargets and Therapy*. Informa UK Limited, Volume 9, pp. 1–11. doi: 10.2147/itt.s202006.

- Gust, J. *et al.* (2017) 'Endothelial activation and blood–brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells', *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc., 7(12), pp. 1404–1419. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0698.
- Hackl, H. *et al.* (2010) 'Tetracycline regulator expression alters the transcriptional program of mammalian cells', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 5(9), p. e13013. doi: 10.1371/journal.pone.0013013.
- Hamieh, M. *et al.* (2019) 'CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape', *Nature*. Nature Publishing Group, 568(7750), pp. 112–116. doi: 10.1038/s41586-019-1054-1.
- Han, H. J. *et al.* (2012) 'Strain background influences neurotoxicity and behavioral abnormalities in mice expressing the tetracycline transactivator', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 32(31), pp. 10574–10586. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0893-12.2012.
- Hanssens, H. *et al.* (2021) 'The antigen-binding moiety in the driver's seat of CARs Heleen Hanssens and Fien Meeus indicate shared co-first authorship'. doi: 10.1002/med.21818.
- Harkins, R. N. *et al.* (2008) 'Regulated expression of the interferon- β gene in mice', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 15(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/sj.gt.3302998.
- Haso, W. *et al.* (2013) 'Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia', *Blood*. Blood, 121(7), pp. 1165–1171. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002.
- He, X. and Xu, C. (2020) 'Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy', *Cell Research*. Springer Nature, pp. 660–669. doi: 10.1038/s41422-020-0343-4.
- Ho, J. Y. *et al.* (2021) 'Promoter usage regulating the surface density of CAR molecules may modulate the kinetics of CAR-T cells in vivo', *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. Cell Press, 21, pp. 237–246. doi: 10.1016/j.omtm.2021.03.007.
- Hudeček, J. *et al.* (2020) 'Application of a risk-management framework for integration of stromal tumor-infiltrating lymphocytes in clinical trials', *npj Breast Cancer*. Nature Research. doi: 10.1038/s41523-020-0155-1.
- Hwang, J. R. *et al.* (2020) 'Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development', *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature, pp. 750–761. doi: 10.1038/s12276-020-0435-8.
- Ishii, K. *et al.* (2020) 'Perforin-deficient CAR T cells recapitulate late-onset inflammatory toxicities observed in patients', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 130(10), pp. 5425–5443. doi: 10.1172/JCI130059.
- Jackson, Z. *et al.* (2020) 'Automated Manufacture of Autologous CD19 CAR-T Cells for Treatment of Non-hodgkin Lymphoma', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 11, p. 1941. doi: 10.3389/fimmu.2020.01941.
- Jayaraman, Jayapriya Melody, MichaP., L. *et al.* (2020) 'CAR-T design: Elements and their synergetic function', *EBioMedicine*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102931.
- Kagoya, Y. *et al.* (2018) 'A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 24(3), pp. 352–359. doi: 10.1038/nm.4478.
- Kang, L. *et al.* (2020) 'Characterization of novel dual tandem CD19/BCMA chimeric antigen receptor T cells to potentially treat multiple myeloma', *Biomarker Research*. BioMed Central Ltd., 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s40364-020-00192-6.
- Karbach, J. *et al.* (2012) 'Phase I clinical trial of mixed bacterial vaccine (Coley's toxins) in patients with NY-ESO-1 expressing cancers: Immunological effects and clinical activity', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 18(19), pp. 5449–5459. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1116.
- Kawalekar, O. U. *et al.* (2016) 'Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells', *Immunity*. Cell Press, 44(2), pp. 380–390. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.021.

- Kiesgen, S. *et al.* (2021) ‘Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity’, *Nature Protocols*. Nature Research, pp. 1331–1342. doi: 10.1038/s41596-020-00467-0.
- Klein, C. *et al.* (2017) ‘Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines’, *OncoImmunology*. Taylor and Francis Inc., 6(3). doi: 10.1080/2162402X.2016.1277306.
- Klichinsky, M. *et al.* (no date) ‘Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy’, *Nature Biotechnology*. doi: 10.1038/s41587-020-0462-y.
- Kosicki, M., Tomberg, K. and Bradley, A. (2018) ‘Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements’, *Nature Biotechnology*, 36(8). doi: 10.1038/nbt.4192.
- Krishna, S. *et al.* (2020) ‘Stem-like CD8 T cells mediate response of adoptive cell immunotherapy against human cancer’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 370(6522), pp. 1328–1334. doi: 10.1126/science.abb9847.
- Larson, R. C. and Maus, M. V. (2021) ‘Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells’, *Nature Reviews Cancer*. Nature Research, pp. 145–161. doi: 10.1038/s41568-020-00323-z.
- Leung, W. H. *et al.* (2019) ‘Sensitive and adaptable pharmacological control of CAR T cells through extracellular receptor dimerization’, *JCI Insight*. American Society for Clinical Investigation, 4(11). doi: 10.1172/jci.insight.124430.
- Li, D. *et al.* (2019) ‘Genetically engineered t cells for cancer immunotherapy’, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature, pp. 1–17. doi: 10.1038/s41392-019-0070-9.
- Li, L. Z. *et al.* (2020) ‘A report on Lineage switch at relapse of CD19 CAR-T therapy for Philadelphia chromosome-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia’, *Chinese medical journal*. NLM (Medline), pp. 2001–2003. doi: 10.1097/CM9.0000000000000962.
- Li, Q. and Ding, Z. Y. (2020) ‘The Ways of Isolating Neoantigen-Specific T Cells’, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., p. 1347. doi: 10.3389/fonc.2020.01347.
- Liefhebber, J. M. *et al.* (2019) ‘In-Depth Characterization of a Mifepristone-Regulated Expression System for AAV5-Mediated Gene Therapy in the Liver’, *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. Cell Press, 13, pp. 512–525. doi: 10.1016/j.omtm.2019.05.002.
- Lindner, S. E. *et al.* (2020) ‘Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications’, *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science, p. eaaz3223. doi: 10.1126/sciadv.aaz3223.
- Liu, D., Zhao, J. and Song, Y. (2019) ‘Engineering switchable and programmable universal CARs for CAR T therapy’, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd., pp. 1–9. doi: 10.1186/s13045-019-0763-0.
- Liu, E. *et al.* (2020) ‘Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors’, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 382(6), pp. 545–553. doi: 10.1056/nejmoa1910607.
- Liu, H. *et al.* (2017) ‘Targeting alpha-fetoprotein (AFP)-MHC complex with CART-cell therapy for liver cancer’, *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 23(2), pp. 478–488. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1203.
- Long, A. H. *et al.* (2015) ‘4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors’, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 21(6), pp. 581–590. doi: 10.1038/nm.3838.
- Majzner, R. G. *et al.* (2020) ‘Tuning the antigen density requirement for car T-cell activity’, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc., 10(5), pp. 702–723. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0945.
- Majzner, R. G. and Mackall, C. L. (2018) ‘Tumor antigen escape from car t-cell therapy’, *Cancer*

Discovery. American Association for Cancer Research Inc., pp. 1219–26. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0442.

Marcos-Gragera, R. (no date) *MANUAL DE CODIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS REDECAN [Modalitat compatibilitat]*.

Marcucci, K. T. *et al.* (2018) ‘Retroviral and Lentiviral Safety Analysis of Gene-Modified T Cell Products and Infused HIV and Oncology Patients’, *Molecular Therapy*. Cell Press, 26(1), pp. 269–279. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.10.012.

Marofi, F. *et al.* (2021) ‘CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities’, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd, pp. 1–16. doi: 10.1186/s13287-020-02128-1.

Martin, F. *et al.* (2016) ‘Molecular Sciences Biased and Unbiased Methods for the Detection of Off-Target Cleavage by CRISPR/Cas9: An Overview’. doi: 10.3390/ijms17091507.

Martín, F. *et al.* (2005) ‘Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences’, *Gene Therapy*. Gene Ther, 12(8), pp. 715–723. doi: 10.1038/sj.gt.3302457.

Martínez Bedoya, D., Dutoit, V. and Migliorini, D. (2021) ‘Allogeneic CAR T Cells: An Alternative to Overcome Challenges of CAR T Cell Therapy in Glioblastoma’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 640082. doi: 10.3389/fimmu.2021.640082.

Maude, S. L. *et al.* (2016) ‘Efficacy of Humanized CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Modified T Cells in Children and Young Adults with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia’, *Blood*. American Society of Hematology, 128(22), pp. 217–217. doi: 10.1182/blood.v128.22.217.217.

Maus, M. V. *et al.* (2002) ‘Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB’, *Nature Biotechnology*. Nat Biotechnol, 20(2), pp. 143–148. doi: 10.1038/nbt0202-143.

Maus, M. V. *et al.* (2014) ‘Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies’, *Blood*. American Society of Hematology, 123(17), pp. 2625–2635. doi: 10.1182/blood-2013-11-492231.

McGowan, E. *et al.* (2020) ‘PD-1 disrupted CAR-T cells in the treatment of solid tumors: Promises and challenges’, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, p. 109625. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109625.

McLellan, A. D. and Ali Hosseini Rad, S. M. (2019) ‘Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation’, *Immunology and Cell Biology*. John Wiley and Sons Inc., pp. 664–674. doi: 10.1111/imcb.12254.

McMurchy, A. N. *et al.* (2013) ‘A novel function for FOXP3 in humans: Intrinsic regulation of conventional T cells’, *Blood*. Blood, 121(8), pp. 1265–1275. doi: 10.1182/blood-2012-05-431023.

Mhaidly, R. and Verhoeven, E. (2019) ‘The Future: In Vivo CAR T Cell Gene Therapy’, *Molecular Therapy*. Cell Press, pp. 707–709. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.03.012.

Milone, M. C. and O’Doherty, U. (2018) ‘Clinical use of lentiviral vectors’, *Leukemia*. Nature Publishing Group, pp. 1529–1541. doi: 10.1038/s41375-018-0106-0.

Mitra, D. (1996) ‘HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4+ T cells in vitro and in vivo: Association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid’, *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, 87(4), pp. 581–585. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.510589.x.

Mitsuyasu, R. T. *et al.* (2000) ‘Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 ζ gene-modified autologous CD4+ and CD8+ T cells in human immunodeficiency virus–infected subjects’, *Blood*. American Society of Hematology, 96(3), pp. 785–793. doi: 10.1182/blood.v96.3.785.

Mondal, M. *et al.* (2020) ‘Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy’, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16. doi: 10.1080/21645515.2020.1723363.

Monjezi, R. *et al.* (2017) ‘Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors’, *Leukemia*. Nature Publishing Group, 31(1), pp. 186–194. doi:

10.1038/leu.2016.180.

Morimoto, M. and Kopan, R. (2009) 'rtTA toxicity limits the usefulness of the SP-C-rtTA transgenic mouse', *Developmental Biology*. Academic Press Inc., 325(1), pp. 171–178. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.10.013.

Morris, E. C. *et al.* (2021) 'Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41577-021-00547-6.

Muñoz, P. *et al.* (2020) 'WAS Promoter-Driven Lentiviral Vectors Mimic Closely the Lopsided WASP Expression during Megakaryocytic Differentiation'. doi: 10.1016/j.omtm.2020.09.006.

Navarro-Marchal, S. A. *et al.* (2021) 'Anti-CD44-Conjugated Olive Oil Liquid Nanocapsules for Targeting Pancreatic Cancer Stem Cells', *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 22(4), pp. 1374–1388. doi: 10.1021/acs.biomac.0c01546.

Neelapu, S. S. *et al.* (2017) 'Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 377(26), pp. 2531–2544. doi: 10.1056/nejmoa1707447.

Nishida, T. *et al.* (2021) 'Chimeric ζ CD20-CD28-CD3 – of Anti Target Antigen Density Governs the Efficacy'. doi: 10.4049/jimmunol.1402346.

Nordstrom, J. L. (2003) 'The antiprogestin-dependent GeneSwitch® system for regulated gene therapy', in *Steroids*. Elsevier Inc., pp. 1085–1094. doi: 10.1016/j.steroids.2003.07.008.

O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L. and Smyth, M. J. (2019) 'Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, pp. 151–167. doi: 10.1038/s41571-018-0142-8.

Ortiz-Maldonado, V. *et al.* (2021) 'CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies', *Molecular Therapy*. Cell Press, 29(2), pp. 636–644. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.027.

Paijens, S. T. *et al.* (2021) 'Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era', *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature, pp. 842–859. doi: 10.1038/s41423-020-00565-9.

Patarroyo S., J. H. and Vargas V, M. I. (2013) 'Apoptosis and Activation-Induced Cell Death', in *Apoptosis*. InTech. doi: 10.5772/52805.

Pavlovic, K. *et al.* (2020) 'Using Gene Editing Approaches to Fine-Tune the Immune System', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2020.570672.

Qasim, W. *et al.* (2017) 'Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells', *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, 9(374). doi: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.

Ramos, C. A. *et al.* (2018) 'In Vivo Fate and Activity of Second- versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas', *Molecular Therapy*. Cell Press, 26(12), pp. 2727–2737. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.009.

Raza, A. *et al.* (2020) 'Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy', *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd., p. 140. doi: 10.1186/s12967-020-02306-y.

Recchia, A. *et al.* (2007) 'Gamma-Retroviral and Lentiviral Vectors Have Different Preferences for Specific Classes of Genes and Specific Genomic Features in Human Hematopoietic Cells', *Blood*. American Society of Hematology, 110(11), pp. 3732–3732. doi: 10.1182/blood.v110.11.3732.3732.

Restifo, N. P. *et al.* (1993) 'Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: Immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I', *Journal of Immunotherapy*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 14(3), pp. 182–190. doi: 10.1097/00002371-199310000-00004.

Ribas, A. *et al.* (2017) 'Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-

- PD-1 Immunotherapy', *Cell*. Cell Press, 170(6), pp. 1109-1119.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.027.
- Riley, J. L., June, C. H. and Blazar, B. R. (2009) 'Human T Regulatory Cell Therapy: Take a Billion or So and Call Me in the Morning', *Immunity*. NIH Public Access, pp. 656-665. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.006.
- Roddie, C. *et al.* (2019) 'Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges', *Cytotherapy*. Elsevier B.V., 21(3), pp. 327-340. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.11.009.
- Rosenberg, S. A. *et al.* (1988) 'Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 319(25), pp. 1676-1680. doi: 10.1056/nejm19881223192527.
- Rosenberg, S. A. *et al.* (1990) 'Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 323(9), pp. 570-578. doi: 10.1056/nejm199008303230904.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P. and Lafreniere, R. (1986) 'A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes', *Science*, 233(4770), pp. 1318-1321. doi: 10.1126/science.3489291.
- Sabatino, M. *et al.* (2016) 'Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD81 memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies', *Blood*. American Society of Hematology, 128(4), pp. 519-528. doi: 10.1182/blood-2015-11-683847.
- Sachdeva, M. *et al.* (2019) 'Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-13088-3.
- Sadelain, M., Rivière, I. and Riddell, S. (2017) 'Therapeutic T cell engineering'. doi: 10.1038/nature22395.
- Sakemura, R. *et al.* (2016) 'A Tet-On Inducible system for controlling CD19-Chimeric antigen receptor expression upon drug administration', *Cancer Immunology Research*. American Association for Cancer Research Inc., 4(8), pp. 658-668. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0043.
- Salter, A. I. *et al.* (2018) 'Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 11(544). doi: 10.1126/scisignal.aat6753.
- Sánchez-Hernández, S. *et al.* (2018) 'The IS2 Element Improves Transcription Efficiency of Integration-Deficient Lentiviral Vector Episomes', *Molecular Therapy: Nucleic Acid*, 13, pp. 16-28. doi: 10.1016/j.omtn.2018.08.007.
- Santomasso, B. D. *et al.* (2018) 'Clinical and biological correlates of neurotoxicity associated with car t-cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc., 8(8), pp. 958-971. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1319.
- Savage, P. (2016) 'Chemotherapy curable malignancies and cancer stem cells: A biological review and hypothesis', *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd., 16(1), pp. 1-11. doi: 10.1186/s12885-016-2956-z.
- Schubert, M.-L. *et al.* (2021) 'Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy'. doi: 10.1016/j.annonc.2020.10.478.
- Shah, N. N. and Fry, T. J. (2019) 'Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, pp. 372-385. doi: 10.1038/s41571-019-0184-6.
- Sharma, P. and Allison, J. P. (2015) 'Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential', *Cell*. Cell Press, pp. 205-214. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.030.
- Siegler, E. L. and Kenderian, S. S. (2020) 'Neurotoxicity and Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Insights Into Mechanisms and Novel Therapies', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2020.01973.
- Sim, M. J. W. *et al.* (2020) 'High-affinity oligoclonal TCRs define effective adoptive T cell therapy targeting mutant KRAS-G12D', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America. National Academy of Sciences, 117(23), pp. 12826–12835. doi: 10.1073/pnas.1921964117.
- Stadtmauer, E. A. *et al.* (2020) ‘CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 367(6481). doi: 10.1126/science.aba7365.
- Sterner, R. M. *et al.* (2019) ‘GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts’, *Blood*. American Society of Hematology, 133(7), pp. 697–709. doi: 10.1182/blood-2018-10-881722.
- Strati, P. *et al.* (2020) ‘Clinical efficacy of anakinra to mitigate CAR T-cell therapy associated toxicity in large B-cell lymphoma’, *Blood Advances*. American Society of Hematology, pp. 3123–3127. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002328.
- Styczyński, J. (2020) ‘A brief history of car-t cells: From laboratory to the bedside’, *Acta Haematologica Polonica*. Sciendo, pp. 2–5. doi: 10.2478/ahp-2020-0002.
- Sullivan, R. *et al.* (2015) ‘Global cancer surgery: Delivering safe, affordable, and timely cancer surgery’, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group, pp. 1193–1224. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00223-5.
- Sung, H. *et al.* (2021) ‘Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Wiley, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Tokarew, N. *et al.* (2019) ‘Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells’, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 26–37. doi: 10.1038/s41416-018-0325-1.
- Toscano, M. G. *et al.* (2008) ‘Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein’, *Human Gene Therapy*. Hum Gene Ther, 19(2), pp. 179–197. doi: 10.1089/hum.2007.098.
- Tristán-Manzano, M. *et al.* (2020) ‘Externally-Controlled Systems for Immunotherapy: From Bench to Bedside’, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2020.02044.
- Turchiano, G. *et al.* (2021) ‘Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq’, *Cell Stem Cell*. Cell Press, 28(6), pp. 1136–1147.e5. doi: 10.1016/j.stem.2021.02.002.
- Umansky, V. *et al.* (2019) ‘Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy’, *Frontiers in Immunology* / www.frontiersin.org, 10, p. 168. doi: 10.3389/fimmu.2019.00168.
- Vaddepally, R. K. *et al.* (2020) ‘Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence’, *Cancers*. MDPI AG. doi: 10.3390/cancers12030738.
- Vargas, J. E. *et al.* (2016) ‘Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: Advances, current challenges and perspectives’, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd., p. 288. doi: 10.1186/s12967-016-1047-x.
- Vitale, C. and Strati, P. (2020) ‘CAR T-Cell Therapy for B-Cell non-Hodgkin Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Trials and Real-World Experiences’, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., p. 849. doi: 10.3389/fonc.2020.00849.
- Voorhees, T. J. and Beaven, A. W. (2020) ‘Therapeutic updates for relapsed and refractory classical hodgkin lymphoma’, *Cancers*. MDPI AG, pp. 1–16. doi: 10.3390/cancers12102887.
- Wagner, D. L. *et al.* (2021) ‘Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy’, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research, pp. 379–393. doi: 10.1038/s41571-021-00476-2.
- Waldman, A. D., Fritz, J. M. and Lenardo, M. J. (no date) ‘A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice’, *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/s41577-020-0306-5.
- Walker, A. J. *et al.* (2017) ‘Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase’, *Molecular Therapy*. American Society of Gene and Cell Therapy, 25(9), pp. 2189–2201. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.06.008.
- Wang, D. Y. *et al.* (2018) ‘Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis’, *JAMA Oncology*. American Medical Association, 4(12), pp. 1721–

1728. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.3923.

Weber, E. W. *et al.* (2021) 'Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 372(6537). doi: 10.1126/science.aba1786.

Xie, G. *et al.* (2020) 'CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer', *EBioMedicine*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102975.

Yáñez, L., Sánchez-Escamilla, M. and Perales, M. A. (2019) 'CAR T cell toxicity: Current management and future directions', *HemaSphere*. Wolters Kluwer Health. doi: 10.1097/HS9.000000000000186.

Yazdanifar, M. *et al.* (2019) 'Overcoming Immunological Resistance Enhances the Efficacy of A Novel Anti-tMUC1-CAR T Cell Treatment against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cells*. NLM (Medline), 8(9). doi: 10.3390/cells8091070.

Zahavi, D. and Weiner, L. (no date) 'Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy'. doi: 10.3390/antib9030034.

Zaretsky, J. M. *et al.* (2016) 'Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 375(9), pp. 819–829. doi: 10.1056/nejmoa1604958.

Zhang, J. and Wang, L. (2019) 'The emerging world of TCR-T cell trials against cancer: A systematic review', *Technology in Cancer Research and Treatment*. SAGE Publications Inc. doi: 10.1177/1533033819831068.

Zhang, L. *et al.* (2011) 'Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment', *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, 19(4), pp. 751–759. doi: 10.1038/mt.2010.313.

Zhang, R. Y. *et al.* (2019) 'Doxycycline Inducible Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting CD147 for Hepatocellular Carcinoma Therapy', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., 7, p. 233. doi: 10.3389/fcell.2019.00233.

Zhang, W. *et al.* (2018) 'characterization of clinical grade cD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated cliniMacs Prodigy system', *Drug Design, Development and Therapy*, pp. 12–3343. doi: 10.2147/DDDT.S175113.

Zhao, L. and Cao, Y. J. (2019) 'Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 2250. doi: 10.3389/fimmu.2019.02250.

Zhao, Q. *et al.* (2021) 'Engineered TCR-T Cell Immunotherapy in Anticancer Precision Medicine: Pros and Cons', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., p. 812. doi: 10.3389/fimmu.2021.658753.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

En este apartado indicamos las publicaciones que incluyen parte de los resultados de esta tesis.

1. Patente Internacional (aval)

WO2020099572 - POLYNUCLEOTIDE FOR SAFER AND MORE EFFECTIVE IMMUNOTHERAPIES.

Con los siguientes indicadores de calidad:

- Patente licenciada para su explotación a LentiStem Biotech S.L.
- Empleada para la Captación de financiación pública (Neotec-200.000euros) y privada en base a las potenciales aplicaciones de la patente.
- Patente empleada en la petición un ensayo clínico a la convocatoria del ISCIII en colaboración con el H. Reina Sofía de Córdoba para ensayos clínicos independientes.

2. Artículo publicado en MedRivx (sin revisión por pares)

Physiological (TCR-like) regulated lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells, medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.17.21253300>

3. Artículo original

WAS Promoter-Driven Lentiviral Vectors Mimic Closely the Lopsided WASP Expression during Megakaryocytic Differentiation. Pilar Muñoz, María Tristán-Manzano, Almudena Sánchez-Gilbert, Giorgia Santilli, Anne Galy, Adrian J. Thrasher Francisco Martin. Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 19 December 2020.

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 27 November 2019 (27.11.2019)

Information valid as of: 30 March 2020 (30.03.2020)

Report generated on: 22 June 2021 (22.06.2021)

(10) Publication number:

WO2020/099572

(43) Publication date:

22 May 2020 (22.05.2020)

(26) Publication language:

English (EN)

(21) Application Number:

PCT/EP2019/081346

(22) Filing Date:

14 November 2019 (14.11.2019)

(25) Filing language:

English (EN)

(31) Priority number(s):

18380016.8 (EP)

(31) Priority date(s):

14 November 2018 (14.11.2018)

(31) Priority status:

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:

A61P 35/00 (2006.01); **C07K 14/725** (2006.01); **C12N 5/0783** (2010.01); **C12N 15/86** (2006.01)

(71) Applicant(s):

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD [ES/ES]; Avenida Américo Vespucio, nº 15 Edificio S2. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES) (*for all designated states*)

(72) Inventor(s):

MARTIN MOLINA, Francisco; Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud Avenida Américo Vespucio, nº 15 Edificio S2. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES)

TRISTÁN MANZANO, María; Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud Avenida Américo Vespucio, nº 15 Edificio S2. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES)

MALDONADO PÉREZ, Noelia; Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud Avenida Américo Vespucio, nº 15 Edificio S2. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES)

BENABDELLAH EL KHLANJI, Karim; Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud Avenida Américo Vespucio, nº 15 Edificio S2. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES)

MUÑOZ FERNÁNDEZ, Pilar; Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud Avenida Américo Vespucio, nº 15 Edificio S2. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES)

(74) Agent(s):

HOFFMANN EITLE, S.L.U.; Paseo de la Castellana 140 Planta 3ª. Edificio Lima 28046 Madrid (ES)

(54) Title (EN): POLYNUCLEOTIDE FOR SAFER AND MORE EFFECTIVE IMMUNOTHERAPIES

(54) Title (FR): POLYNUCLÉOTIDE POUR DES IMMUNOTHÉRAPIES PLUS SÛRES ET PLUS EFFICACES

(57) Abstract:

(EN): The present invention provides polynucleotides and viral vectors for transfection of a mammalian host cell, preferably lentiviral vectors, encoding at least one CAR (chimeric antigen receptors) and a promoter from the Wiskott-Aldrich syndrome locus, in particular the promoter of SEQ. ID NO 1, operably linked to the CAR in order to drive its expression.

(FR): La présente invention concerne des polynucléotides et des vecteurs viraux pour la transfection d'une cellule hôte de mammifère, de préférence des vecteurs lentiviraux, codant pour au moins un CAR (récepteur antigénique chimérique) et un promoteur du locus du syndrome Wiskott-Aldrich, en particulier le promoteur de SEQ. ID NO 1, lié de manière fonctionnelle au CAR afin d'entraîner son expression.

International search report:

Received at International Bureau: 19 February 2020 (19.02.2020) [EP]

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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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



(51) International Patent Classification:

A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/725 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2019/081346

(22) International Filing Date:

14 November 2019 (14.11.2019)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

18380016.8 14 November 2018 (14.11.2018) EP

(71) Applicant: **FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD** [ES/ES]; Avenida Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2. Parque Científico y, Tecnológico Cartuja, 41092 Sevilla (ES).

(72) Inventors: **MARTIN MOLINA, Francisco**; Fundación Pública Andaluza, Progreso y Salud, Avenida Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2. Parque Científico y, Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES). **TRISTÁN MANZANO, María**; Fundación Pública Andaluza, Progreso y Salud, Avenida Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2. Parque Científico y, Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES). **MALDONADO PÉREZ, Noelia**; Fundación Pública Andaluza, Progreso y Salud, Avenida Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2. Parque Científico y, Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES). **BENABDELLAH EL KHLANJI, Karim**; Fundación Pública Andaluza, Progreso y Salud, Avenida Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2. Parque Científico y, Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES). **MUÑOZ FERNÁNDEZ, Pilar**; Fundación Pública Andaluza, Progreso y Salud, Avenida Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2. Parque Científico y, Tecnológico Cartuja 41092 Sevilla (ES).

(74) Agent: **HOFFMANN EITLE, S.L.U.**; Paseo de la Castellana 140, Planta 3ª. Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE FOR SAFER AND MORE EFFECTIVE IMMUNOTHERAPIES

(57) Abstract: The present invention provides polynucleotides and viral vectors for transfection of a mammalian host cell, preferably lentiviral vectors, encoding at least one CAR (chimeric antigen receptors) and a promoter from the Wiskott-Aldrich syndrome locus, in particular the promoter of SEQ. ID NO 1, operably linked to the CAR in order to drive its expression.



Polynucleotide for safer and more effective immunotherapies

Field of the invention

5 The present invention relates to a new technology to generate immunotherapeutic T cells. In particular, the invention provides an improved system to generate immunotherapeutic T cells comprising a chimeric antigen receptor (CAR).

Background of the invention

10

Adoptive immunotherapy, which involves the transfer of autologous antigen-specific T cells generated *ex vivo*, is a promising strategy to treat viral infections and cancer. The T cells used for adoptive immunotherapy can be generated either by expansion of antigen-specific T cells or redirection of T cells through genetic engineering (June, C. and Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptor Therapy NEJM 2018:379(1);64-73). Transfer of viral antigen specific T cells is a well-established procedure used for the treatment of transplant associated viral infections and rare viral-related malignancies. Similarly, isolation and transfer of tumor specific T cells has been shown to be successful in treating melanoma.

20

Novel specificities in T cells have been successfully generated through the genetic transfer of transgenic T cell receptors or chimeric antigen receptors (CARs) (Jena, Dotti et al. 2010). CARs are synthetic receptors consisting of a targeting moiety that is associated with one or more signalling domains in a single fusion molecule. In general, the binding moiety of a CAR consists of an antigen-binding domain of a single-chain antibody (scFv), comprising the light and variable fragments of a monoclonal antibody joined by a flexible linker. Binding moieties based on receptor or ligand domains have also been used successfully. The signalling domains for first generation CARs are derived from the cytoplasmic region of the CD3zeta or the Fc receptor gamma chains. First generation CARs have been shown to successfully redirect T-cell cytotoxicity, however, they failed to provide prolonged expansion and antitumor activity *in vivo*. Signaling domains from co-stimulatory molecules including CD28, OX-40 (CD134), and 4-1BB (CD137) have been added alone (second generation) or in combination (third generation) to enhance survival and increase proliferation of CAR

25
30

modified T cells. CARs have successfully allowed T cells to be redirected against antigens expressed at the surface of tumor cells from various malignancies including lymphomas and solid tumors (Jena, Dotti et al. 2010). CD19 has been presented as an attractive target for immunotherapy because the vast majority of B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) uniformly express CD19, whereas expression is absent on non-hematopoietic cells, as well as myeloid, erythroid, T cells and bone marrow stem cells. Clinical trials targeting CD19 on B-cell malignancies are underway with encouraging anti-tumor responses. Most infuse T cells genetically modified to express a chimeric antigen receptor (CAR) with specificity derived from the scFv region of a CD19-specific mouse monoclonal antibody FMC63 (Nicholson, Lenton et al. 1997; Cooper, Topp et al. 2003; Cooper, Jena et al. 2012) (International application: WO2013/126712). However, there is still a need to improve construction of CARs that show better compatibility with T-cell proliferation, in order to allow the cells expressing such CARs to reach a significant clinical advantage. In this sense and in spite of the clear-cut benefit for the patients treated with CAR-T, actual technologies using strong promoters to express CARs comes with a down side. Severe side effects, including patient deaths, have been reported mainly due to a cytokine release syndrome (CRS) associated with hyper-activity of the CAR-T cells in the first days after infusion. In addition, a significant percentage of patients that responded initially, relapsed as a consequence of reduce longevity (and efficacy) of administrated CAR-T cells. Eyquem, Mansilla-Soto et al. have already demonstrated that TCR-like expression improve anti-leukemic activity of CAR-T cells using genome editing systems to express transgenes through the TRAC locus promoter. However, genome editing strategies use very sophisticated technologies difficult to implement in clinical practice.

We have thus tested a panel of different LV (lentiviral vectors) backbones to investigate the transgene expression profiles on T cells at different times after TCR activation and compare such expression pattern with the TCR expression profile. Our data showed that the AW backbone, expressing the transgene through a chimeric promoter from the Wiskott-Aldrich syndrome locus follows closely the expression of the TCR. Importantly, contrary to the other promoters analysed (EF1a, CMV,) the AW fails to increase the expression levels of the transgene upon TCR activation, which is of especial relevance to reduce CRS intensity.

Brief description of the figures

Figure 1. Scheme of the AW LVs backbone (Ref Frecha et al. Gene Ther. 2008 Jun;15(12):930-41). The Chimeric WAS promoter is represented by purple arrows. The transgene (i.e. CAR) is represented by a red arrow. LTR from HIV-1 are represented by the dashed terminal arrows.

Figure 2. CD3 surface expression in human T cells after CD3/CD28 stimulation. A) Scheme showing the stimulation of T cells using TransAct Reagent (Miltenyi), a nanomatrix of anti-CD3/CD28 molecules that would mimic TCR intracellular signaling in a physiological situation. B) Drawing showing the experiment procedure: CD3 expression was measured by flow cytometry at 0, 8, 24, 48, 96h and 7days after stimulation using anti-CD3-PerCP-Cy5 (OKT3 clon, Biosciences 1:100). C) Graph showing CD3 expression levels analyzed at the different time points. Data represent the ratio of the Median of Fluorescence Intensity (MeFI) of the CD3+ population related to the CD3- population at each time point.

Figure 3. Schematic representation of the different lentiviral vectors in the study. All the LVs are constructed in a self-inactivated (SIN) backbone expressing the enhanced Green Fluorescence Protein (eGFP) under different promoters: AWE LVs drive eGFP expression through the chimeric endogenous promoter from the Wiskott-Aldrich Syndrome gene; EFEWP LV, under the control of the elongation factor 1-alpha (EF1 α) promoter and CEWP LV under the cytomegalovirus (CMV) promoter. The WPRE has been removed from the AWE LV backbone to reduce expression levels and to better control expression levels.

Figure 4. The AWE LV mimics the expression profile of the TCR. A) Scheme showing the experiment set up. T cells were stimulated with TransAct reagent during 48h and transduced with the different LVs at day -10. 10 days later the T cells were analyzed for TCR (CD3-PerCP-Cy5 (OKT3, eBiosciences 1:100) and eGFP expression by FACS (Day 0). The cells were then stimulated again with TransAct and analyzed at 8h, 24h, 48h, 72h and 96 h. B) Graph showing CD3 (Black circles) and eGFP (color symbols) expression levels analyzed at the different time points. Data represent the ratio of the Median of Fluorescence Intensity (MeFI) of the positive population related to the negative population in the density plots at each time point. C) Graph showing the kinetic of CD3 (Black circles) and eGFP (color symbols)

expression at different time points related to 0h. The same data as in B) is represented to compare the upregulation or downregulation of the expression levels in T cells at the different time points after TCR stimulation. The AWE LVs is the only LV that lower the expression of the transgene upon TCR activation. Both, the EFWP and the CEWP LV increased the expression 3-4 times 24-48h post TCR activation. Most T-CARs express the CAR through the EF1 α promoter. Our hypothesis is that the AWE LV backbone is a good alternative to express CARs due to this TCR-like expression pattern.

Figure 5. Expression kinetic of the TCR(CD3) compared to the different LVs. T cells were stimulated with TransAct reagent during 48h and transduced with the different LVs at day -10. 10 days later, the T cells were analyzed for TCR (CD3-PerCP-Cy5 (OKT3, eBiosciences 1:100)) and eGFP expression by FACS (Day 0). The cells were then stimulated again with TransAct and analyzed at 8h, 24h, 48h and 72h. The graph show the changes in CD3 (Black circles) and eGFP (color symbols) expression related to day 0 at 8h, 24h, 48h and 72h. (Two-tailed T student, $p < 0.05, *$; $p < 0.01, **$; $p < 0.001, ***$. At least three independent experiments were performed).

Figure 6. Physiological stimulation of T cells generates a downregulation of T cell receptor (TCR). Isolated primary T cells (CD3 $^{+}$) were stimulated with a nanomatrix of anti-CD3/CD28 and CD3 expression on the surface (b), FACS analysis) and mRNA levels (c) were determined at indicated time points (a).

Figure 7. CAR expression driven by the EF1- α -promoter is increased after stimulation via TCR and CD19 pathways. a) Scheme indicating the three possible activation pathways: anti-CD3/CD28 (that target only TCR, right); MHC-TCR binding of an antigen presenting cells (e.g B cell, macrophage... center); and CAR signaling after the interaction of CD19 (B cells)-Anti-CD19 CAR (T cell, left). b) Representative FACS histograms of the CAR expression driven by EF1- α -promoter-CAR transduced T cells that shown an increment of both percentage of CAR positive cells and CAR expression after stimulated through the three different methods described above (a). HL-60, a promonocytic cell line, was used as CD19- (negative) cells.

Figure 8. CAR expression kinetics after stimulation. a) CAR-Lentiviral backbones used in that project. ARI, a second-generation CAR that is express under the control of EF1-alpha, was kindly provided by Dr. Manel Juan (developed and patented by the Hospital Clinic Barcelona). WARI uses de SEQ ID NO 2 (W0.5 promoter) to express the CAR and AW uses 5 SEQ ID NO 1 (AW promoter). b) Primary T cells were activated during 48h with anti-CD3/CD28 nanomatrix prior LV-transduction. Cells were let them rest for 10 days before stimulating with HL-60 cells (TCR pathway) or Nalm6 cells (CD19+, CAR/TCR pathway). c) CAR was stained with anti-murine Fab-biotin and streptavidin-PE at indicated times after activation and %CAR positive cells are represented related to 0h. ARI showed a significant 10 increase whereas AWARI mimicked better the CD3 profile (black lines). Unpaired T-Test, two tails. $p < 0.01$, **.

Figure 9. AWARI CAR-T cells lysed CD19+ in vitro and in vivo. a) In vitro lysis experiment. Briefly, CD19+ cells Nalm6 and Namalwa were co-cultured with NT (no-transduced cells), 15 ARI and AWARI-T cells in V-bottom plates and specific lysis was determined after 48h, comparing the % of live target cells given by ARI/AWARI with that percentage given by NT cells (non-CAR specific lysis). b) AWARI-T cells were able to lysed CD19+ cells (~70-80% lysis) in vitro. c) Exhaustion was determined by the surface expression of Tim3. AWARI T cells exhibited less Tim3+ cells after 48h of co-culture with CD19+ cells. d) 3×10^5 Namalwa cells 20 that express eGFP and Nluciferase were inoculated intravenously (IV) in NSG3GM-mice. 3 days later, 5×10^6 cells of NT, ARI, AWARI T cells (expressing a 30% and 25% of CAR+ cells, respectively) were inoculated IV and bioluminescence analysis (BLI) were performed up to 10 days. e) BLI images at day 10 after T cells infusion (control, non-treated mice, only Namalwa; NTD, Non-transduced T cells+ Namalwa) were acquired on an IVIS Spectrum In 25 Vivo Imaging System, PerkinElmer after administration intraperitoneally of the Nanoluc substrate (Promega). f) Photon quantification of BLI for every mice group. Paired T test, two tails. $p < 0.05$, *. $P < 0.01$, **. g) Mice were sacrificed at day 15, and the presence of Namalwa cells (humanCD19+eGFP+ cells) were determined by FACS in bone marrow, spleen and liver, showing that both ARI and AWARI efficiently lysed CD19+ cells in vivo.

Description of the invention

Unless specifically defined herein, all technical and scientific terms used have the same meaning as commonly understood by a skilled artisan in the fields of gene therapy, 5 biochemistry, genetics, and molecular biology. All methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, with suitable methods and materials being described herein. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by 10 reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will prevail. Further, the materials, methods, and examples are illustrative only and are not intended to be limiting, unless otherwise specified.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional 15 techniques of cell biology, cell culture, molecular biology, transgenic biology, microbiology, recombinant DNA, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, for example, 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); 20 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), 25 specifically, 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 30 Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

The inventors have generated specific lentiviral vectors (LV), preferably having a self-inactivated (SIN) backbone, expressing a chimeric antigen receptor (CAR) under different promoters. In particular, we have tested LVs that drive CAR expression made by using the AWE promoter containing a 387 bp fragment of the WAS alternative promoter immediately "upstream" of the 500 bp WAS proximal promoter present in the WE vector (SEQ ID NO 1); the EFEWP lentiviral vector under the control of the elongation factor 1-alpha (EF1 α) promoter and the CEWP lentiviral vector under the citomegalovirus (CMV) promoter, and we have surprisingly found that introduction of the resulting CARs into primary T cells indicates that only the lentiviral vector containing the AWE promoter of SEQ ID NO 1, follows closely the expression of the TCR. Importantly, and contrary to the other promoters analyzed (EF1 α , CMV), the AWE did not increase the expression levels of the transgene upon TCR activation, which is certainly of especial relevance to reduce CRS intensity.

The present invention thus provides polynucleotides and viral vectors for transfection of a mammalian host cell, preferably lentiviral vectors, encoding the above described CAR and a promoter from the Wiskott-Aldrich syndrome locus, in particular, the promoter of SEQ ID NO 1, operably linked to the CAR in order to drive its expression. In a preferred embodiment, the present invention relates to a polynucleotide or vector comprising a promoter that drives the expression of the CAR, having at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%, 95% 97%, 99% or 100% sequence identity with a fragment of SEQ ID NO 1 that comprises nucleotide 388 to nucleotide 887 (SEQ ID NO 2) of said sequence. In another preferred embodiment, the present invention relates to a polynucleotide or vector comprising a promoter that drives the expression of the CAR, having at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%, 95% 97%, or 99 % sequence identity with SEQ ID NO 1.

In a preferred embodiment, said polynucleotides are included in lentiviral vectors in view of being stably expressed in the cells.

To direct, transmembrane polypeptide into the secretory pathway of a host cell, a secretory signal sequence (also known as a leader sequence, prepro sequence or pre sequence) can be provided in the polynucleotide sequence or vector sequence of the invention. The secretory

signal sequence is operably linked to the transmembrane nucleic acid sequence, i.e., the two sequences are joined in the correct reading frame and positioned to direct the newly synthesized polypeptide into the secretory pathway of the host cell. Secretory signal sequences are commonly positioned 5' to the nucleic acid sequence encoding the polypeptide of interest, although certain secretory signal sequences may be positioned elsewhere in the nucleic acid sequence of interest (see, e.g., Welch et al., U.S. Patent No. 5,037,743; Holland et al., U.S. Patent No. 5,143,830). Those skilled in the art will recognize that, in view of the degeneracy of the genetic code, considerable sequence variation is possible among these polynucleotide molecules. Preferably, the nucleic acid sequences of the present invention are codon-optimized for expression in mammalian cells, preferably for expression in human cells. Codon-optimization refers to the exchange in a sequence of interest of codons that are generally rare in highly expressed genes of a given species by codons that are generally frequent in highly expressed genes of such species, such codons encoding the amino acids as the codons that are being exchanged.

15

Methods of engineering an immune cell:

In an encompassed particular embodiment, the invention relates to a method of preparing immune cells for immunotherapy comprising the introduction into said immune cells the polynucleotide or vector according to the present invention and expanding said cells. In particular embodiment, the invention relates to a method of engineering an immune cell that comprises providing a cell and expressing at the surface of said cell at least one CAR as described above. In a particular embodiment, the method comprises transforming or transducing the cell with at least one polynucleotide or vector encoding CAR as described above, and expressing said polynucleotides into said cell.

25

In another embodiment, said method further comprises a step of genetically modifying said cell by inactivating at least one gene expressing one component of the TCR, a target for an immunosuppressive agent, HLA gene and/or an immune checkpoint gene such as PD1 or CTLA-4. In a preferred embodiment, said gene is selected from the group consisting of TCRalpha, TCRbeta, CD52, GR, PD1 and CTLA-4. In a preferred embodiment said method

30

further comprises introducing into said T cells a rare-cutting endonuclease able to selectively inactivate by DNA cleavage said genes. In a more preferred embodiment said rare-cutting endonuclease is TALE-nuclease or Cas9 endonuclease.

Delivery methods

- 5 The different methods described above involve introducing CAR into a cell by using expression vectors. As non-limiting example, said CAR can be introduced as transgenes encoded by one lentiviral vector.

Immune cells

The present invention also relates to isolated cells or cell lines susceptible to be obtained by
10 said method to engineer cells. In particular said isolated cell comprises at least one CAR and a promoter from the Wiskott-Aldrich syndrome locus, in particular of SEQ ID NO 1, operably linked to the CAR in order to drive its expression. In another embodiment, said isolated cell comprises a population of CARs and promoters from the Wiskott-Aldrich syndrome locus, in particular of SEQ ID NO 1, operably linked to the CARs in order to drive their expression,
15 each one comprising different extracellular ligand binding domains. Immune cells of the present invention are activated and proliferate independently of antigen binding mechanisms.

In the scope of the present invention is also encompassed an isolated immune cell,
20 preferably a T-cell obtained according to any one of the methods previously described. Said immune cell refers to a cell of hematopoietic origin functionally involved in the initiation and/or execution of innate and/or adaptative immune response. Said immune cell according to the present invention can be derived from a stem cell. The stem cells can be adult stem cells, non-human embryonic stem cells, more particularly non-human stem cells, cord blood
25 stem cells, progenitor cells, bone marrow stem cells, induced pluripotent stem cells, totipotent stem cells or hematopoietic stem cells. Representative human cells are CD34+ cells. Said isolated cell can also be a dendritic cell, killer dendritic cell, a mast cell, a NK-cell, a B-cell or a T-cell selected from the group consisting of inflammatory T-lymphocytes, cytotoxic T-lymphocytes, regulatory T-lymphocytes or helper T-lymphocytes. In another
30 embodiment, said cell can be derived from the group consisting of CD4+ T-lymphocytes and

CD8+ T-lymphocytes. Prior to expansion and genetic modification of the cells of the invention, a source of cells can be obtained from a subject through a variety of non-limiting methods. Cells can be obtained from a number of non-limiting sources, including peripheral blood mononuclear cells, bone marrow, lymph node tissue, cord blood, thymus tissue, tissue from a site of infection, ascites, pleural effusion, spleen tissue, and tumors. In certain 5 embodiments of the present invention, any number of T cell lines available and known to those skilled in the art, may be used. In another embodiment, said cell can be derived from a healthy donor, from a patient diagnosed with cancer or from a patient diagnosed with an infection. In another embodiment, said cell is part of a mixed population of cells which 10 present different phenotypic characteristics. In the scope of the present invention is also encompassed a cell line obtained from a transformed T- cell according to the method previously described. Modified cells resistant to an immunosuppressive treatment and susceptible to be obtained by the previous method are encompassed in the scope of the present invention.

15

Activation and expansion of T cells

Whether prior to or after the generation of the transformed or transduced T cells, even if the modified immune cells of the present invention are activated and proliferate independently of antigen binding mechanisms, the immune cells, particularly T-cells of the 20 present invention can be further activated and expanded generally using methods as described, for example, in U.S. Patents 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; and U.S. Patent Application Publication No. 20060121005. T cells can be expanded in vitro or in vivo. Generally, the T cells of the 25 invention are expanded by contact with an agent that stimulates a CD3/TCR complex and a co-stimulatory molecule on the surface of the T cells to create an activation signal for the T-cell. For example, chemicals such as calcium ionophore A23187, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), or mitogenic lectins like phytohemagglutinin (PHA) can be used to create an activation signal for the T-cell.

30

As non-limiting examples, T cell populations may be stimulated in vitro such as by contact with an anti-CD3 antibody, or antigen-binding fragment thereof, or an anti-CD2 antibody immobilized on a surface, or by contact with a protein kinase C activator (e.g., bryostatin) in conjunction with a calcium ionophore. For co-stimulation of an accessory molecule on the surface of the T cells, a ligand that binds the accessory molecule is used. For example, a population of T cells can be contacted with an anti-CD3 antibody and an anti-CD28 antibody, under conditions appropriate for stimulating proliferation of the T cells. Conditions appropriate for T cell culture include an appropriate media (e.g., Minimal Essential Media or RPMI Media 1640 or, X-vivo 5, (Lonza)) that may contain factors necessary for proliferation and viability, including serum (e.g., fetal bovine or human serum), interleukin-2 (IL-2), insulin, IFN-g , 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, - 2, 1L-15, TGF, and TNF- or any other additives for the growth of cells. Other additives for the growth of cells include, but are not limited to, surfactant, plasmanate, and reducing agents such as N-acetyl- cysteine and 2-mercaptoethanol. Media can include RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a- MEM, F-12, X-Vivo 1, and X-Vivo 20, Optimizer, with added amino acids, sodium pyruvate, and vitamins, either serum-free or supplemented with an appropriate amount of serum (or plasma) or a defined set of hormones, and/or an amount of cytokine(s) sufficient for the growth and expansion of T cells. Antibiotics, e.g., penicillin and streptomycin, are included only in experimental cultures, not in cultures of cells that are to be infused into a subject. The target cells are maintained under conditions necessary to support growth, for example, an appropriate temperature (e.g., 37° C) and atmosphere (e.g., air plus 5% CO₂). T cells that have been exposed to varied stimulation times may exhibit different characteristics.

In another particular embodiment, said cells can be expanded by co-culturing with tissue or cells. Said cells can also be expanded in vivo, for example in the subject's blood after administering said cell into the subject.

Therapeutic applications

In another embodiment, isolated cells obtained by the different methods or cell line derived from said isolated cell as previously described can be used as a medicament. In another embodiment, said medicament can be used for treating cancer, particularly for the treatment of B-cell lymphomas and leukemia in a patient in need thereof. In another

embodiment, said isolated cell according to the invention or cell line derived from said isolated cell can be used in the manufacture of a medicament for treatment of a cancer in a patient in need thereof.

5 In another aspect, the present invention relies on methods for treating patients in need thereof, said method comprising at least one of the following steps:

(a) providing an immune-cell obtainable by any one of the methods previously described;

(b) Administrating said transformed immune cells to said patient.

10 On one embodiment, said T cells of the invention can undergo robust in vivo T cell expansion and can persist for an extended amount of time.

Said treatment can be ameliorative, curative or prophylactic. It may be either part of an autologous immunotherapy or part of an allogenic immunotherapy treatment. By
15 autologous, it is meant that cells, cell line or population of cells used for treating patients are originating from said patient. By allogenic is meant that the cells or population of cells used for treating patients are not originated from said patient but from a donor.

Cells that can be used with the disclosed methods are described in the previous section. Said
20 treatment can be used to treat patients diagnosed with cancer. Cancers that may be treated may comprise nonsolid tumors (such as hematological tumors, including but not limited to pre-B ALL (pediatric indication), adult ALL, mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma and the like). Types of cancers to be treated with the CARs of the invention include, but are not limited to certain leukemia or lymphoid malignancies. Adult
25 tumors/cancers and pediatric tumors/cancers are also included. It can be a treatment in combination with one or more therapies against cancer selected from the group of antibodies therapy, chemotherapy, cytokines therapy, dendritic cell therapy, gene therapy, hormone therapy, laser light therapy and radiation therapy.

According to a preferred embodiment of the invention, said treatment can be administered into patients undergoing an immunosuppressive treatment. Indeed, the present invention preferably relies on cells or population of cells, which have been made resistant to at least one immunosuppressive agent due to the inactivation of a gene encoding a receptor for such immunosuppressive agent. In this aspect, the immunosuppressive treatment should help the selection and expansion of the T-cells according to the invention within the patient. The administration of the cells or population of cells according to the present invention may be carried out in any convenient manner, including by aerosol inhalation, injection, ingestion, transfusion, implantation or transplantation. The compositions described herein may be administered to a patient subcutaneously, intradermally, intratumorally, intranodally, intramedullary, intramuscularly, by intravenous or intralymphatic injection, or intraperitoneally. In one embodiment, the cell compositions of the present invention are preferably administered by intravenous injection.

The administration of the cells or population of cells can consist of the administration of 104-109 cells per kg body weight, preferably 105 to 106 cells/kg body weight including all integer values of cell numbers within those ranges. The cells or population of cells can be administered in one or more doses. In another embodiment, said effective amount of cells are administered as a single dose. In another embodiment, said effective amount of cells are administered as more than one dose over a period time. Timing of administration is within the judgment of managing physician and depends on the clinical condition of the patient. The cells or population of cells may be obtained from any source, such as a blood bank or a donor. While individual needs vary, determination of optimal ranges of effective amounts of a given cell type for a particular disease or conditions within the skill of the art. An effective amount means an amount which provides a therapeutic or prophylactic benefit. The dosage administered will be dependent upon the age, health and weight of the recipient, kind of concurrent treatment, if any, frequency of treatment and the nature of the effect desired. In another embodiment, said effective amount of cells or composition comprising those cells are administered parenterally. Said administration can be an intravenous administration. Said administration can be directly done by injection within a tumor.

In certain embodiments of the present invention, cells are administered to a patient in conjunction with (e.g., before, simultaneously or following) any number of relevant treatment modalities, including but not limited to treatment with agents such as antiviral therapy, cidofovir and interleukin-2, Cytarabine (also known as ARA-C) or natalizimab treatment for MS patients or efalizimab treatment for psoriasis patients or other treatments for PML patients. In further embodiments, the T cells of the invention may be used in combination with chemotherapy, radiation, immunosuppressive agents, such as cyclosporin, azathioprine, methotrexate, mycophenolate, and FK506, antibodies, or other immunoablative agents such as CAM PATH, anti-CD3 antibodies or other antibody therapies, cytoxin, fludarabine, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycoplienolic acid, steroids, FR901228, cytokines, and irradiation. These drugs inhibit either the calcium dependent phosphatase calcineurin (cyclosporine and FK506) or inhibit the p70S6 kinase that is important for growth factor induced signaling (rapamycin) (Henderson, Naya et al. 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander et al. 1993). In a further embodiment, the cell compositions of the present invention are administered to a patient in conjunction with (e.g., before, simultaneously or following) bone marrow transplantation, T cell ablative therapy using either chemotherapy agents such as, fludarabine, external-beam radiation therapy (XRT), cyclophosphamide, or antibodies such as OKT3 or CAMPATH. In another embodiment, the cell compositions of the present invention are administered following B-cell ablative therapy such as agents that react with CD20, e.g., Rituxan. For example, in one embodiment, subjects may undergo standard treatment with high dose chemotherapy followed by peripheral blood stem cell transplantation. In certain embodiments, following the transplant, subjects receive an infusion of the expanded immune cells of the present invention. In an additional embodiment, expanded cells are administered before or following surgery. Other definitions

25 - Unless otherwise specified, "a," "an," "the," and "at least one" are used interchangeably and mean one or more than one.- Amino acid residues in a polypeptide sequence are designated herein according to the one-letter code, in which, for example, Q. means Gln or Glutamine residue, R means Arg or Arginine residue and D means Asp or Aspartic acid residue.

30 - Amino acid substitution means the replacement of one amino acid residue with another, for instance the replacement of an Arginine residue with a Glutamine residue in a peptide

sequence is an amino acid substitution. - Nucleotides are designated as follows: one-letter code is used for designating the base of a nucleoside: a is adenine, t is thymine, c is cytosine, and g is guanine. For the degenerated nucleotides, r represents g or a (purine nucleotides), k represents g or t, s represents g or c, w represents a or t, m represents a or c, y represents t or c (pyrimidine nucleotides), d represents g, a or t, v represents g, a or c, b represents g, t or c, h represents a, t or c, and n represents g, a, t or c.

"As used herein, "nucleic acid" or "polynucleotides" refers to nucleotides and/or polynucleotides, such as deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA), oligonucleotides, fragments generated by the polymerase chain reaction (PCR), and fragments generated by any of ligation, scission, endonuclease action, and exonuclease action. Nucleic acid molecules can be composed of monomers that are naturally-occurring nucleotides (such as DNA and RNA), or analogues of naturally-occurring nucleotides (e.g., enantiomeric forms of naturally-occurring nucleotides), or a combination of both. Modified nucleotides can have alterations in sugar moieties and/or in pyrimidine or purine base moieties. Sugar modifications include, for example, replacement of one or more hydroxyl groups with halogens, alkyl groups, amines, and azido groups, or sugars can be functionalized as ethers or esters. Moreover, the entire sugar moiety can be replaced with sterically and electronically similar structures, such as aza-sugars and carbocyclic sugar analogs. Examples of modifications in a base moiety include alkylated purines and pyrimidines, acylated purines or pyrimidines, or other well-known heterocyclic substitutes. Nucleic acid monomers can be linked by phosphodiester bonds or analogs of such linkages. Nucleic acids can be either single stranded or double stranded.

- By chimeric antigen receptor (CAR) is intended molecules that combine a binding domain against a component present on the target cell, for example an antibody-based specificity for a desired antigen (e.g., tumor antigen) with a T cell receptor-activating intracellular domain to generate a chimeric protein that exhibits a specific anti-target cellular immune activity. Generally, CAR consists of an extracellular single chain antibody (scFv) fused to the intracellular signaling domain of the T cell antigen receptor complex zeta chain (scFv) and have the ability, when expressed in T cells, to redirect antigen recognition based on the monoclonal antibody specificity.

- By "delivery vector" or "delivery vectors" is intended any delivery vector which can be used in the present invention to put into cell contact (i.e "contacting") or deliver inside cells or subcellular compartments (i.e "introducing") agents/chemicals and molecules (proteins or nucleic acids) needed in the present invention. It includes, but is not limited to liposomal
5 delivery vectors, viral delivery vectors, drug delivery vectors, chemical carriers, polymeric carriers, lipoplexes, polyplexes, dendrimers, microbubbles (ultrasound contrast agents), nanoparticles, emulsions or other appropriate transfer vectors. These delivery vectors allow delivery of molecules, chemicals, macromolecules (genes, proteins), or other vectors such as plasmids, peptides. In these cases, delivery vectors are molecule carriers. By "delivery
10 vector" or "delivery vectors" is also intended delivery methods to perform transfection.

- The terms "vector" or "vectors" refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. A "vector" in the present invention includes, but is not limited to, a viral vector, a plasmid, a RNA vector or a linear or circular DNA or RNA molecule which may consists of a chromosomal, non chromosomal, semisynthetic or
15 synthetic nucleic acids. Preferred vectors are those capable of autonomous replication (episomal vector) and/or expression of nucleic acids to which they are linked (expression vectors). Large numbers of suitable vectors are known to those of skill in the art and commercially available.

Viral vectors include retrovirus, adenovirus, parvovirus (e. g. adenoassociated viruses),
20 coronavirus, negative strand RNA viruses such as orthomyxovirus (e. g., influenza virus), rhabdovirus (e. g., rabies and vesicular stomatitis virus), paramyxovirus (e. g. measles and Sendai), positive strand RNA viruses such as picornavirus and alphavirus, and double-stranded DNA viruses including adenovirus, herpesvirus (e. g., Herpes Simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus), and poxvirus (e. g., vaccinia, fowlpox a
25 ndcanarypox). Other viruses include Norwalk virus, togavirus, flavivirus, reoviruses, papovavirus, hepadnavirus, and hepatitis virus, for example. Examples of retroviruses include: avian leukosis-sarcoma, mammalian C-type, B-type viruses, D type viruses, HTLV-BLV group, lentivirus, spumavirus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven
30 Publishers, Philadelphia, 1996).

- By "lentiviral vector" is meant HIV-Based lentiviral vectors that are very promising for gene delivery because of their relatively large packaging capacity, reduced immunogenicity and their ability to stably transduce with high efficiency a large range of different cell types. Lentiviral vectors are usually generated following transient transfection of three (packaging, envelope and transfer) or more plasmids into producer cells. Like HIV, lentiviral vectors enter the target cell through the interaction of viral surface glycoproteins with receptors on the cell surface. On entry, the viral RNA undergoes reverse transcription, which is mediated by the viral reverse transcriptase complex. The product of reverse transcription is a double-stranded linear viral DNA, which is the substrate for viral integration in the DNA of infected cells. By "integrative lentiviral vectors (or LV)", is meant such vectors as non-limiting example, that are able to integrate the genome of a target cell. At the opposite by "non-integrative lentiviral vectors (or NILV)" is meant efficient gene delivery vectors that do not integrate the genome of a target cell through the action of the virus integrase.

- Delivery vectors and vectors can be associated or combined with any cellular permeabilization techniques such as sonoporation or electroporation or derivatives of these techniques. - By cell or cells is intended any eukaryotic living cells, primary cells and cell lines derived from these organisms for in vitro cultures.

- By "primary cell" or "primary cells" are intended cells taken directly from living tissue (i.e. biopsy material) and established for growth in vitro, that have undergone very few population doublings and are therefore more representative of the main functional components and characteristics of tissues from which they are derived from, in comparison to continuous tumorigenic or artificially immortalized cell lines.

As non limiting examples cell lines can be selected from the group consisting of CHO-K1 cells; HEK293 cells; Caco2 cells; U2-OS cells; NIH 3T3 cells; NSO cells; SP2 cells; CHO-S cells; DG44 cells; K-562 cells, U-937 cells; MRC5 cells; IMR90 cells; Jurkat cells; HepG2 cells; HeLa cells; HT-1080 cells; HCT-116 cells; Hu-h7 cells; Huvec cells; Molt 4 cells.

All these cell lines can be modified by the method of the present invention to provide cell line models to produce, express, quantify, detect, study a gene or a protein of interest; these models can also be used to screen biologically active molecules of interest in research and

production and various fields such as chemical, biofuels, therapeutics and agronomy as non-limiting examples.

- by "mutation" is intended the substitution, deletion, insertion of up to one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, twenty, 5 twenty five, thirty, forty, fifty, or more nucleotides/amino acids in a polynucleotide (cDNA, gene) or a polypeptide sequence. The mutation can affect the coding sequence of a gene or its regulatory sequence. It may also affect the structure of the genomic sequence or the structure/stability of the encoded mRNA.

- by "variant(s)", it is intended a repeat variant, a variant, a DNA binding variant, a TALE- 10 nuclease variant, a polypeptide variant obtained by mutation or replacement of at least one residue in the amino acid sequence of the parent molecule.

- by "functional variant" is intended a catalytically active mutant of a protein or a protein domain; such mutant may have the same activity compared to its parent protein or protein domain or additional properties, or higher or lower activity. -"identity" refers to sequence 15 identity between two nucleic acid molecules or polypeptides. Identity can be determined by comparing a position in each sequence which may be aligned for purposes of comparison. When a position in the compared sequence is occupied by the same base, then the molecules are identical at that position. A degree of similarity or identity between nucleic acid or amino acid sequences is a function of the number of identical or matching 20 nucleotides at positions shared by the nucleic acid sequences. Various alignment algorithms and/or programs may be used to calculate the identity between two sequences, including FASTA, or BLAST which are available as a part of the GCG sequence analysis package (University of Wisconsin, Madison, Wis.), and can be used with, e.g., default setting. For example, polypeptides having at least 70%, 85%, 90%, 95%, 98% or 99% identity to specific 25 polypeptides described herein and preferably exhibiting substantially the same functions, as well as polynucleotide encoding such polypeptides, are contemplated.

- "similarity" describes the relationship between the amino acid sequences of two or more polypeptides. BLASTP may also be used to identify an amino acid sequence having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 87.5%, 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 98%, 99% sequence similarity to a 30 reference amino acid sequence using a similarity matrix such as BLOSUM45, BLOSUM62 or

BLOSUM80. Unless otherwise indicated a similarity score will be based on use of BLOSUM62. When BLASTP is used, the percent similarity is based on the BLASTP positives score and the percent sequence identity is based on the BLASTP identities score. BLASTP "Identities" shows the number and fraction of total residues in the high scoring sequence pairs which are identical; and BLASTP "Positives" shows the number and fraction of residues for which the alignment scores have positive values and which are similar to each other. Amino acid sequences having these degrees of identity or similarity or any intermediate degree of identity of similarity to the amino acid sequences disclosed herein are contemplated and encompassed by this disclosure. The polynucleotide sequences of similar polypeptides are deduced using the genetic code and may be obtained by conventional means. A polynucleotide encoding such a functional variant would be produced by reverse translating its amino acid sequence using the genetic code.

- "signal-transducing domain" or "co-stimulatory ligand" refers to a molecule on an antigen presenting cell that specifically binds a cognate co-stimulatory molecule on a T-cell, thereby providing a signal which, in addition to the primary signal provided by, for instance, binding of a TCR/CD3 complex with an MHC molecule loaded with peptide, mediates a T cell response, including, but not limited to, proliferation activation, differentiation and the like. A co-stimulatory ligand can include but is not limited to CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, inducible costimulatory ligand (ICOS-L), intercellular adhesion molecule (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, lymphotoxin beta receptor, 3/TR6, ILT3, ILT4, an agonist or antibody that binds Toll ligand receptor and a ligand that specifically binds with B7-H3. A co-stimulatory ligand also encompasses, among others, an antibody that specifically binds with a co-stimulatory molecule present on a T cell, such as but not limited to, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, a ligand that specifically binds with CD83.

A "co-stimulatory molecule" refers to the cognate binding partner on a T cell that specifically binds with a co-stimulatory ligand, thereby mediating a co-stimulatory response by the cell, such as, but not limited to proliferation. Co-stimulatory molecules include, but are not limited to an MHC class I molecule, BTLA and Toll ligand receptor.

A "co-stimulatory signal" as used herein refers to a signal, which in combination with primary signal, such as TCR/CD3 ligation, leads to T cell proliferation and/or upregulation or downregulation of key molecules. -The term "extracellular ligand-binding domain" as used herein is defined as an oligo- or polypeptide that is capable of binding a ligand. Preferably, 5 the domain will be capable of interacting with a cell surface molecule. For example, the extracellular ligand-binding domain may be chosen to recognize a ligand that acts as a cell surface marker on target cells associated with a particular disease state. Thus examples of cell surface markers that may act as ligands include those associated with viral, bacterial and parasitic infections, autoimmune disease and cancer cells.

10 The term "subject" or "patient" as used herein includes all members of the animal kingdom including non-human primates and humans.

The above written description of the invention provides a manner and process of making and using it such that any person skilled in this art is enabled to make and use the same, this enablement being provided in particular for the subject matter of the appended claims, 15 which make up a part of the original description.

Where a numerical limit or range is stated herein, the endpoints are included. Also, all values and subranges within a numerical limit or range are specifically included as if explicitly written out.

The above description is presented to enable a person skilled in the art to make and use the 20 invention, and is provided in the context of a particular application and its requirements. Various modifications to the preferred embodiments will be readily apparent to those skilled in the art, and the generic principles defined herein may be applied to other embodiments and applications without departing from the spirit and scope of the invention. Thus, this invention is not intended to be limited to the embodiments shown, but is to be accorded the 25 widest scope consistent with the principles and features disclosed herein.

Having generally described this invention, a further understanding can be obtained by reference to certain specific examples, which are provided herein for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting unless otherwise specified.

Examples

1.1. Construction of eGFP expression vectors

5 The expression of the AW gene, in T cells, is directed through two sequences with promoter activity (promoters). A sequence of approximately 1600 bp from the transcription initiation site, called the proximal promoter of the WAS gene and another one located 6 kb in the 5' direction of the first one, called the alternative promoter of AW, Figure 1A). In Figure 1A the construction diagram of the lentiviral vectors used in the present invention is shown. As seen
10 in said figure, the lentiviral vector WE contains a 500 bp fragment of the proximal WAS promoter that directs the expression of the selected transgene (the CAR protein), as described in: Martin, Toscano et al. to the. 2005; Toscano, Frecha et al. 2008; Toscano, Benabdellah et al. 2009. On the other hand, the lentiviral vector AWE contains a 387 bp fragment of the WAS alternative promoter immediately "upstream" of the 500 bp WAS
15 proximal promoter present in the WE vector (SEQ ID NO 1), as described in : Martin, Toscano et al. 2005; Toscano, Frecha et al. 2008. All vectors share the autoinactivatable region "self-inactivated (SIN) lentiviral backbone" described by (Zufferey, Dull et al., 1998). In the vector pLVTHM, the GFP transgene is expressed under the constitutive EFl-ot promoter ([http: / 'www. Addgene. Org / 12247](http://www.addgene.org/12247)) and the CE vector expresses the GFP transgene under the
20 control of the constitutive promoter of cytomegalovirus (CMV).

1.2. Production of vectors and transduction of T cells

The lentiviral vectors were produced by the co-transfection of the 293T cells with three
25 plasmids: (1) plasmid vector (WE, AWE, CE, and pLVTHM), (2) packaging plasmid (pCMVAR 8.91) and (3) plasmid enveloped VSV-G (pMD2.G), as described in Toscano, Frecha et al. 2004. The packaging and sheath plasmids used were obtained from [http: // www. addgene. org / Didier Trono](http://www.addgene.org/DidierTrono). The day before transfection, 293T cells were plated in Petri dishes treated (Sarstedt, Newton, NC), to ensure exponential growth and 90% confluence. The plasmids
30 pCMVAR 8.91 and pMD2.G were resuspended in 1ml of DMEM (Biowest) together with 45ul LipoD (Signagen) (proportions of plasmid 3: 2 : 1). This mixture was added to the cell culture, previously washed with DMEM. Viral supernatants were collected, filtered through pores

with a diameter of 0.45 μm (Nalgene, Rochester, NY), concentrated by ultracentrifugation (BeckmanCoulter) and resuspended in TexMACs (Milteny) culture medium.

For T cells transduction, cells were isolated by negative selection and activated using TransAct Reagent (Miltenyi), a nanomatrix of anti-CD3/CD28 molecules that would mimic TCR behavior in a physiological situation. 24 hours after stimulation, T cells were incubated with LV at MOI=10.

1.3 TCR expression profile upon activation

T cells were stimulated with TransAct reagent and analyzed at 8h, 24h, 48h, 72h and 96 h for CD3 surface expression using anti-CD3 monoclonal antibodies (*CD3-PerCP-Cy5 (OKT3, eBiosciences 1:100)*) and FACs analysis.

1.4 Expression profile of LVs upon TCR stimulation

T cells were stimulated with TransAct reagent during 48h and transduced with the different LVs at day -10. 10 days later, the T cells were analyzed for TCR (*CD3-PerCP-Cy5 (OKT3, eBiosciences 1:100)*) and *eGFP* expression by FACS (Day 0). The cells were then stimulated again with TransAct and analyzed at 8h, 24h, 48h, 72h and 96 h for both, *eGFP* and CD3 at each time point.

RESULTS

TCR (CD3) EXPRESSION ON T CELLS IS DOWNREGULATED UPON STIMULATION

T cell activation is a fine-tune process regulated by multiple mechanism that render different responses of the T cell. It is well known that the TCR at the surface is downregulated upon TCR engagement, controlling hyper-activation and/or exhaustion of the T cells. In order to see if we could mimic the process in the laboratory, we stimulated of T cells, isolated by negative selection, using TransAct Reagent (Miltenyi), and analyzed CD3 expression by flow

cytometry at 0, 8, 24, 48, 96h and 7days after stimulation. Our data showed that, as expected, that the TCR levels were down-modulated at 8h and 24h post stimulation (Figure 2C) and start to recover at 48h, reaching a new peak of expression at 96h.

5 THE AWE LVs MIMIC THE EXPRESSION PROFILE OF THE TCR IN T CELLS

The group of Dr Sadelain demonstrated that the expression of a CAR following a TCR pattern improves the therapeutic efficacy of CAR-T cells (Eyquem, Mansilla-Soto et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. Nature 2017;543(7643);113-117). However, in their approach, in order to achieve TCR-like expression of the CAR gene, the author used genome editing strategies, which are very sophisticated technologies that are difficult to implement in the clinic. We hypothesized that we can use physiologically regulated LVs to mimic a TCR-like expression, a system that nowadays have a much easier clinical translation that genome edition. We therefore analyzed a panel of LVs expressing eGFP through different promoters (Figure 3). We used the different LVs to transduce T cells and, as indicated in Figure 4A, the cells were analyzed at different time points for eGFP and CD3 expression. We focus our attention in changes on eGFP in the first 96 hours post-stimulation, since this is the time in which we observed changes on TCR expression. As can be observed in Figures 4B and 4C only the AWE LV (pink line) follows the downregulation observed in the TCR (black line) 24 hours post-stimulation. The other LVs, including the EFWP LVs (widely used in CAR T cell therapies) increased their expression levels at this time point. Figure 5 shows a statistical analysis of changes in expression at the different time points related to time=0. Again the AWE is the LV that more closely mimic the changes in TCR expression observed in T cells. These data showed that the AWE LV could also be used to achieve a TCR-like expression pattern of any transgen.

Based on this data, we propose the AWE LV as a new tool to express CARs on T cells for immunotherapy applications. The TCR-like expression of this vector should achieve similar results compared to TCR - CAR gene replacement by genome edition but using a technology that has already been approved in clinic.

In summary, the technology described here, although less fine-tuned than genome editing tools, could render similar therapeutic benefits when applied to the patients and can be much easier to translate into the clinic.

5 Sequence listing

SEQ ID No 1: AWE promoter containing a 387 bp fragment of the WAS alternative promoter immediately "upstream" of the 500 bp WAS proximal promoter present in the WE vector.

10

Taagtcaaaggaggagagggcaacgcggtgggcaggagagaggccaacggccgccggggcgaggggagccggtaggacggg
accaggactggccgacccggccccgcggggaagggggcgccttctcccacaacacaaaacggtgcgcccgggtggccgcc
ctccccagtggtgcccgggtggacgcttccgtgcgcggtccatgccagccattgcgggctgcgggctccaagggtcgaca
cgctggagagtgcaggttgcgggtccaccacagggctgtagacaccctagggtcacacagacaaggctctggacaccacag
gggcacacacattggggagtgggcactcctgggctcacaagactgagaatcactagtgaattcgggattacaggtgtgagctattg
tccccagccaaaaggaaaagttttactgtagtaacccttccggactagggacctcgggctcagcctcaggctacctaggtgcttag
aaaggaggccaccaggcccatgactactccttgccacagggagccctgcacacagatgtgctaagctctcgtgccagccagagg
gaggaggtctgagccagtgcagaaggagatgggccccagagagtaagaaagggggaggaggaccaagctgatccaaaaggtgg
gtctaagcagtcaagtggaggagggtccaatctgatggcggaggggccaagctcagcctaacgaggaggccagggcccaagg
ggccccctggaggacttgtttccctgtcccttgggtttttgcatcttctgttcccttgcctcattgcggaagttccttcttacctgc
accagagcctcgccagagaagacaagggcagaaag

15

20

SEQ ID NO 2. 500 bp fragment of the proximal WAS promoter

25

aattcgggattacaggtgtgagctattgtccccagccaaaaggaaaagttttactgtagtaacccttccggactagggacctcgggcc
tcagcctcaggctacctaggtgcttagaaaggaggccaccaggcccatgactactccttgccacagggagccctgcacacagatg
tgctaagctctcgtgccagccagaggaggaggtctgagccagtgcagaaggagatgggccccagagagtaagaaagggggagg
aggaccaagctgatccaaaaggtgggtctaagcagtcaagtggaggagggtccaatctgatggcggaggggccaagctcagcc
taacgaggaggccagggcccaagggggccctggaggacttgtttccctgtcccttgggtttttgcatcttctgttcccttgcctgct
cattgcggaagttccttcttacctgcaccagagcctcgccagagaagacaagggcagaaag

30

SEQ ID NO 3:387 bp fragment of the WAS alternative promoter

35

taagtcaaaggaggagagggcaacgcggtgggcaggagagaggccaacggccgccggggcgaggggagccggtaggacggg
accaggactggccgacccggccccgcggggaagggggcgccttctcccacaacacaaaacggtgcgcccgggtggccgcc
ctccccagtggtgcccgggtggacgcttccgtgcgcggtccatgccagccattgcgggctgcgggctccaagggtcgaca
cgctggagagtgcaggttgcgggtccaccacagggctgtagacaccctagggtcacacagacaaggctctggacaccacag
gggcacacacattggggagtgggcactcctgggctcacaagactgagaatcactagtg

40

Claims

1. A polynucleotide comprising i) a nucleotide sequence encoding a specific chimeric antigen receptor (CAR) and ii) a promoter from the Wiskott-Aldrich syndrome locus
5 or a fragment of said promoter comprising SEQ ID NO 2 or a nucleotide sequence having at least 70% identity with SEQ ID NO 2, wherein said promoter is operably linked to the nucleotide sequence encoding the CAR in order to drive the expression of the chimeric antigen receptor, and wherein the CAR comprises at least one extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain and at least one
10 intracellular signalling domain.
2. The polynucleotide of claim 1, wherein the promoter comprises SEQ ID NO 1 or a nucleotide sequence having at least 70% identity with SEQ ID NO 1.
- 15 3. The polynucleotide of claim 1, wherein the promoter is SEQ ID NO 1.
4. An expression vector comprising the nucleic acid of any of claims 1 to 3.
5. The expression vector of claim 4, wherein said expression vector is a viral vector.
20
6. The viral vector of claim 5, wherein said viral vector is a lentiviral vector.
7. Immune cells expressing at the cell surface membrane a specific chimeric antigen receptor comprising at least one extracellular ligand binding domain and at least one
25 intracellular signalling domain wherein said Immune cells are transduced with the viral expression vector of any of claims 5 to 6.
8. Immune cells expressing at the cell surface membrane a specific chimeric antigen receptor comprising at least one extracellular ligand binding domain and at least one
30 intracellular signalling domain wherein said chimeric antigen receptor is expressed by the expression vector of claim 4.

9. The immune cells according to any one of claims 7 to 8 derived from inflammatory T-lymphocytes, cytotoxic T-lymphocytes, regulatory T- lymphocytes or helper T-lymphocytes.
- 5 10. The immune cells according to any one of claims 7 to 9, wherein the cells are recovered from donors.
11. The immune cells according to any one of claims 7 to 8, wherein the cells are recovered from patients.
- 10 12. The immune cells according to any one of claims 7 to 11 for use in therapy.
13. The immune cells according to any one of claims 7 to 11 for use in the treatment of cancer, such as neoplasias, B-cell neoplasias, lymphoma or leukaemia, or multiple
15 myeloma.

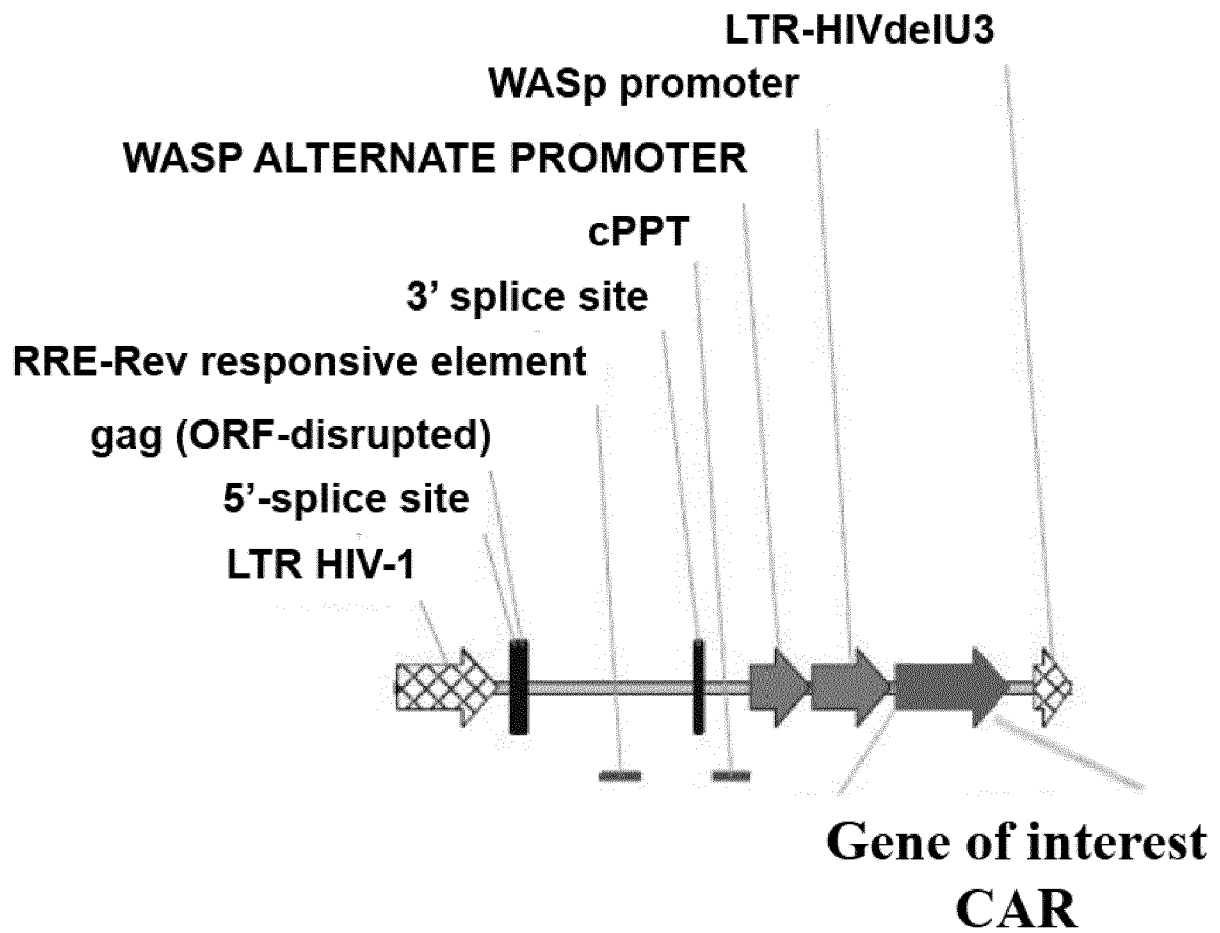


FIG. 1

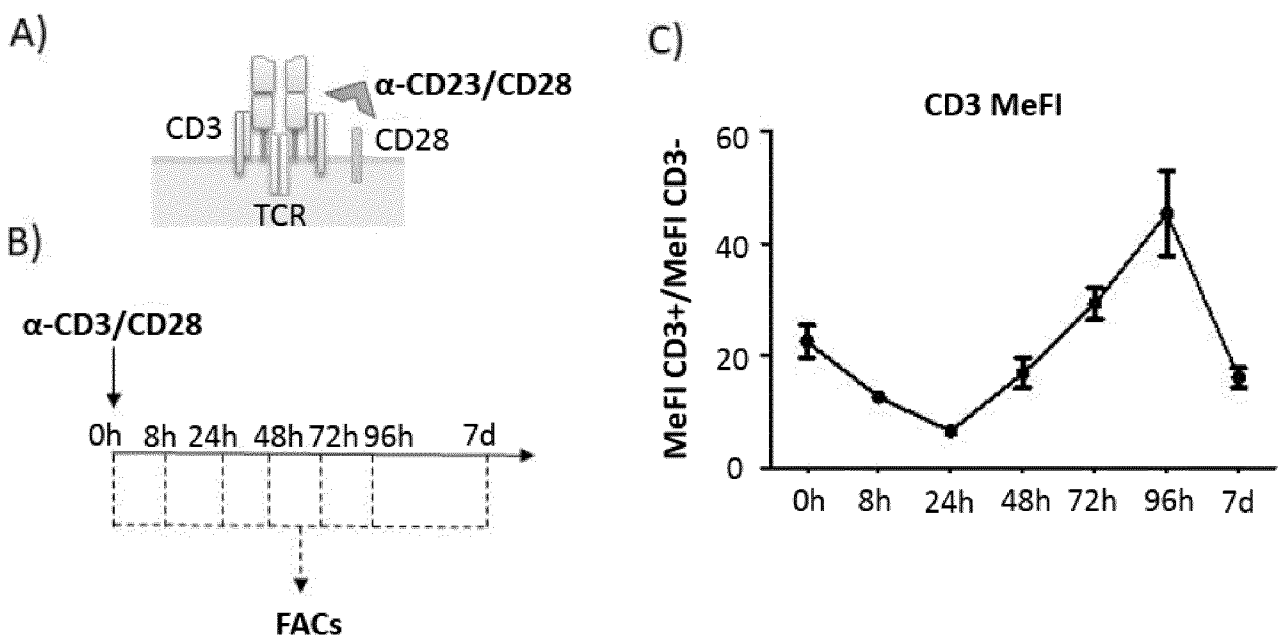


FIG. 2

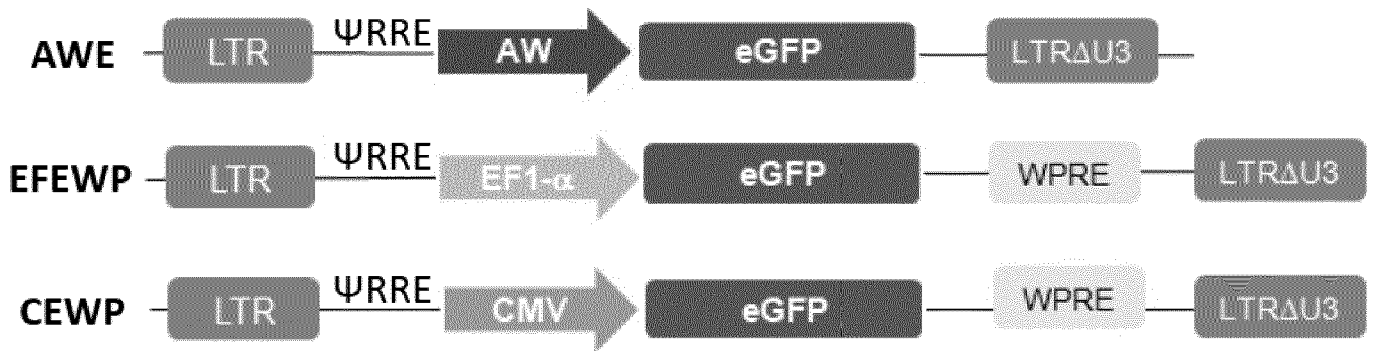


FIG. 3

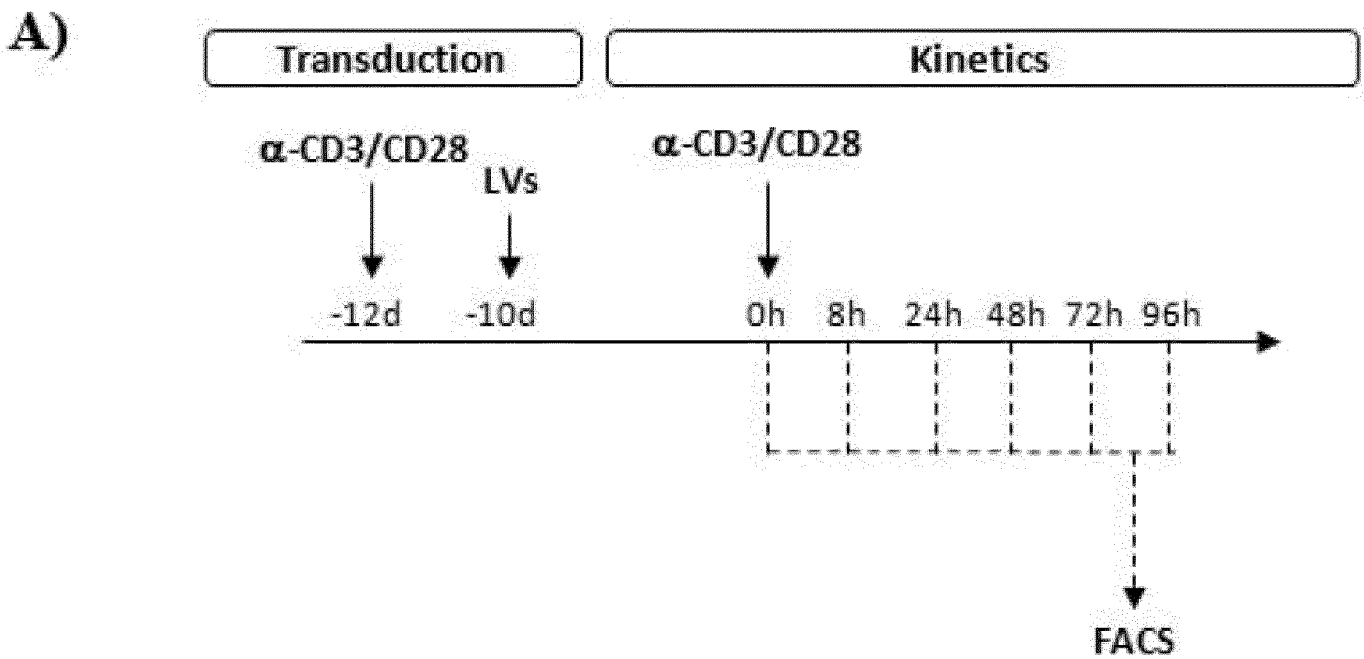
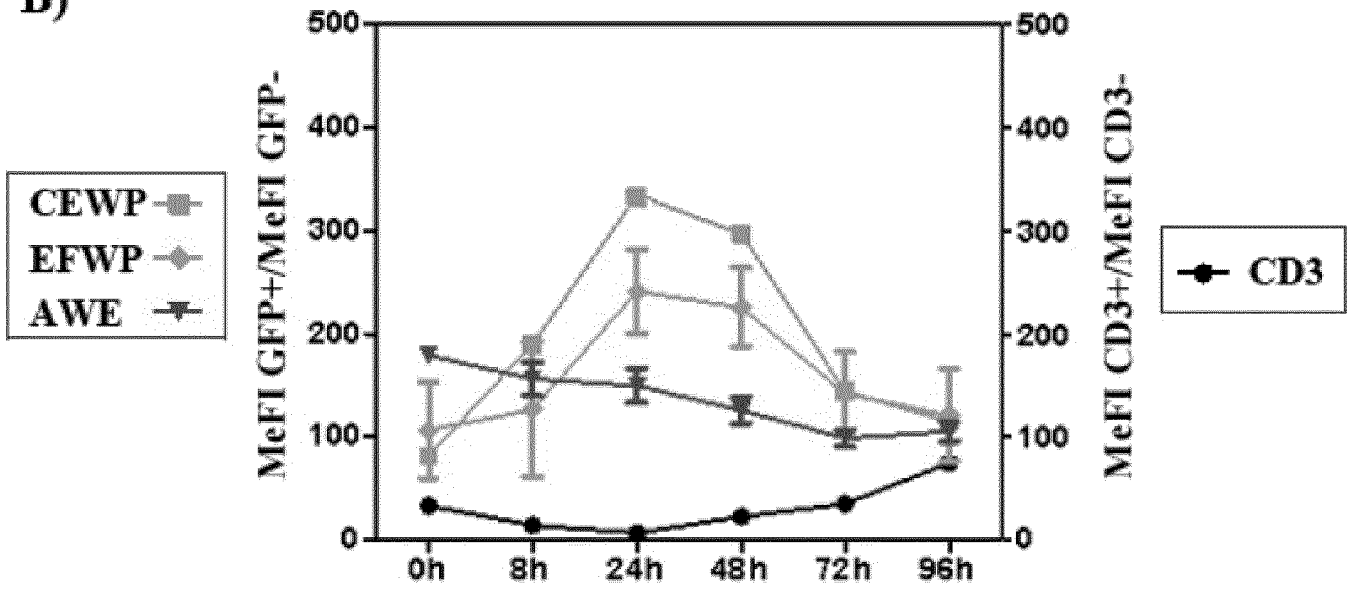


FIG. 4

B)



C)

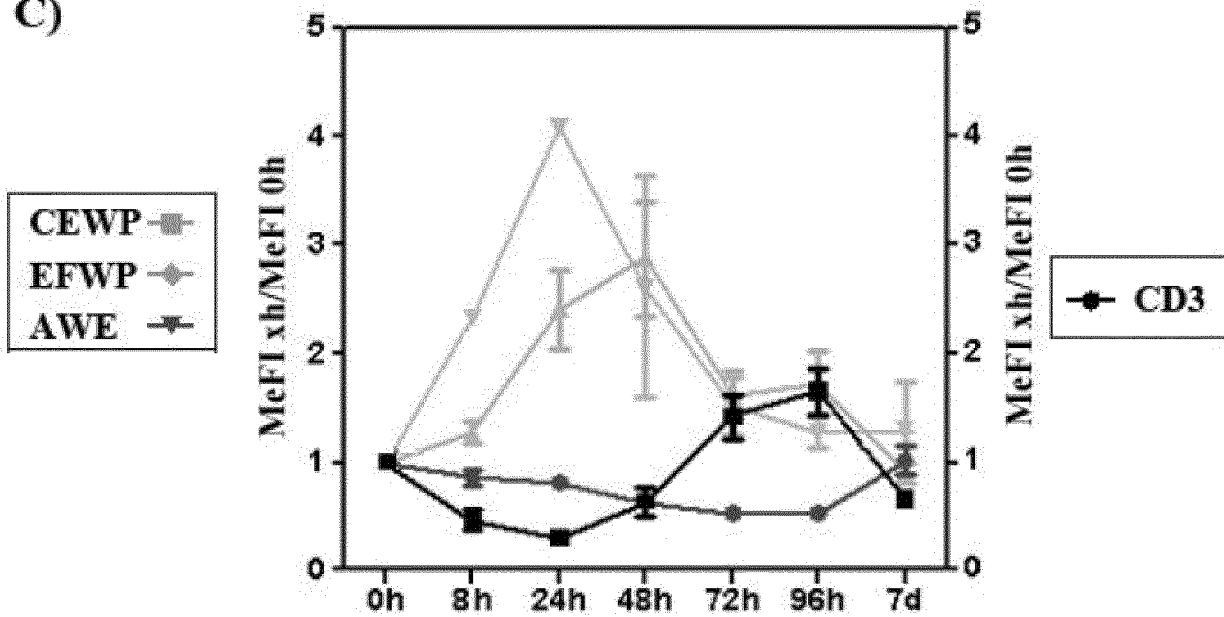


FIG. 4 (continue)

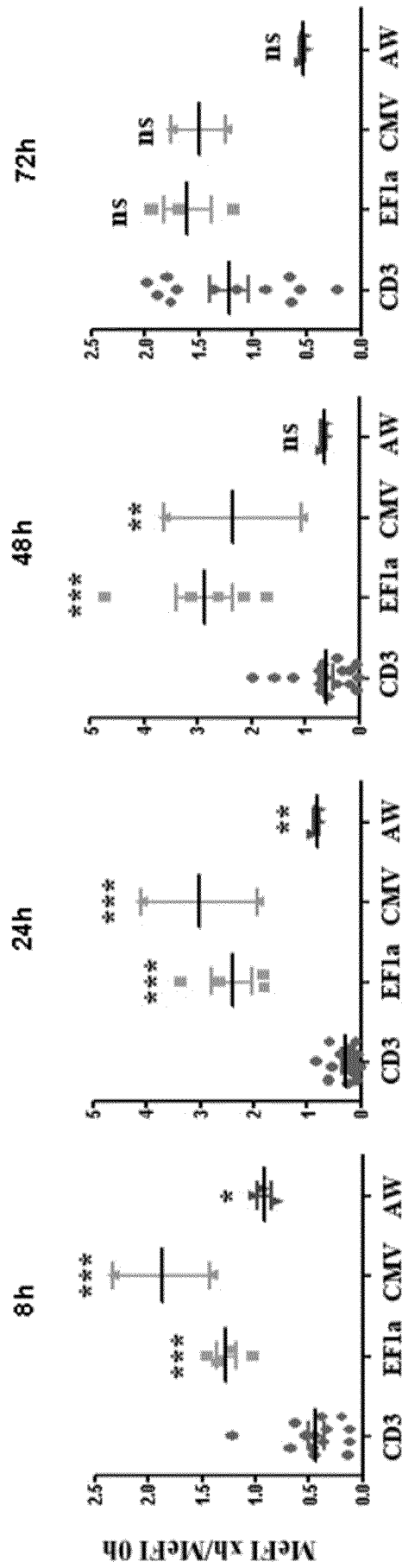
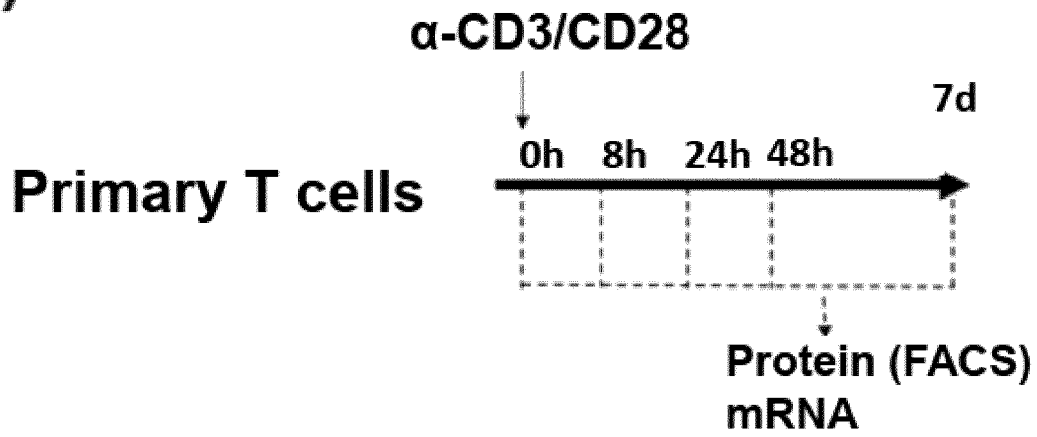


FIG. 5

a)



b)

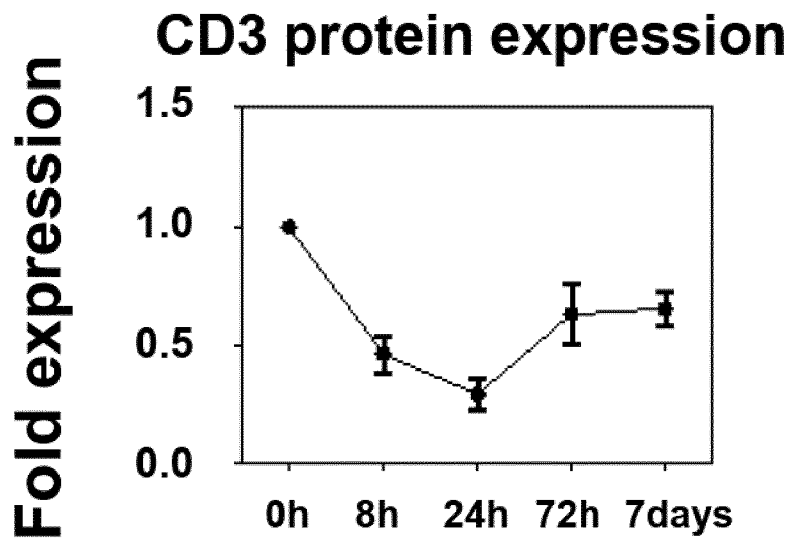


FIG. 6

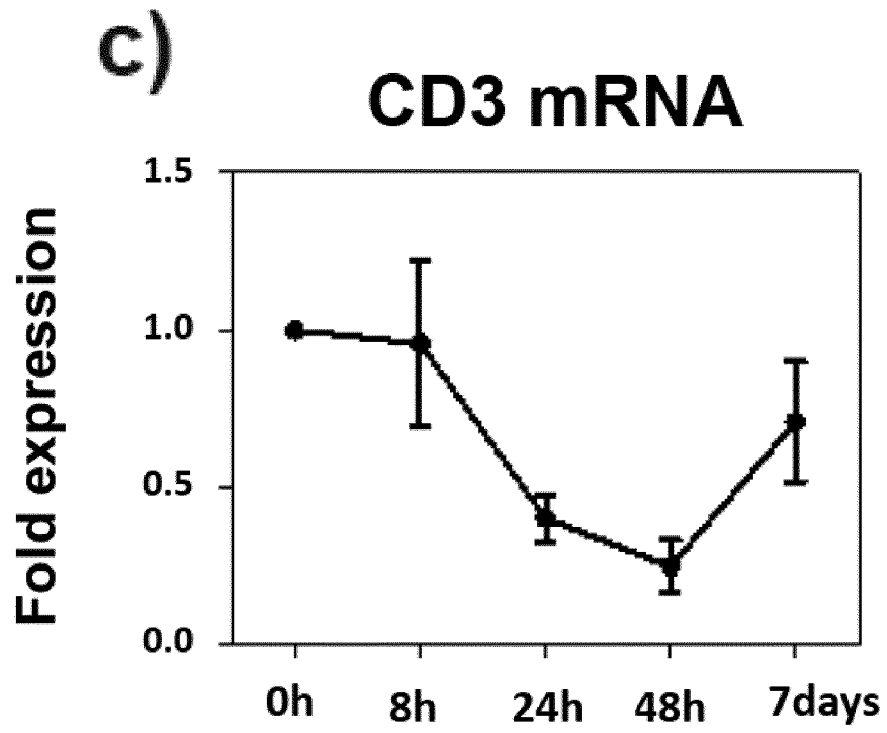


FIG. 6 (continue)

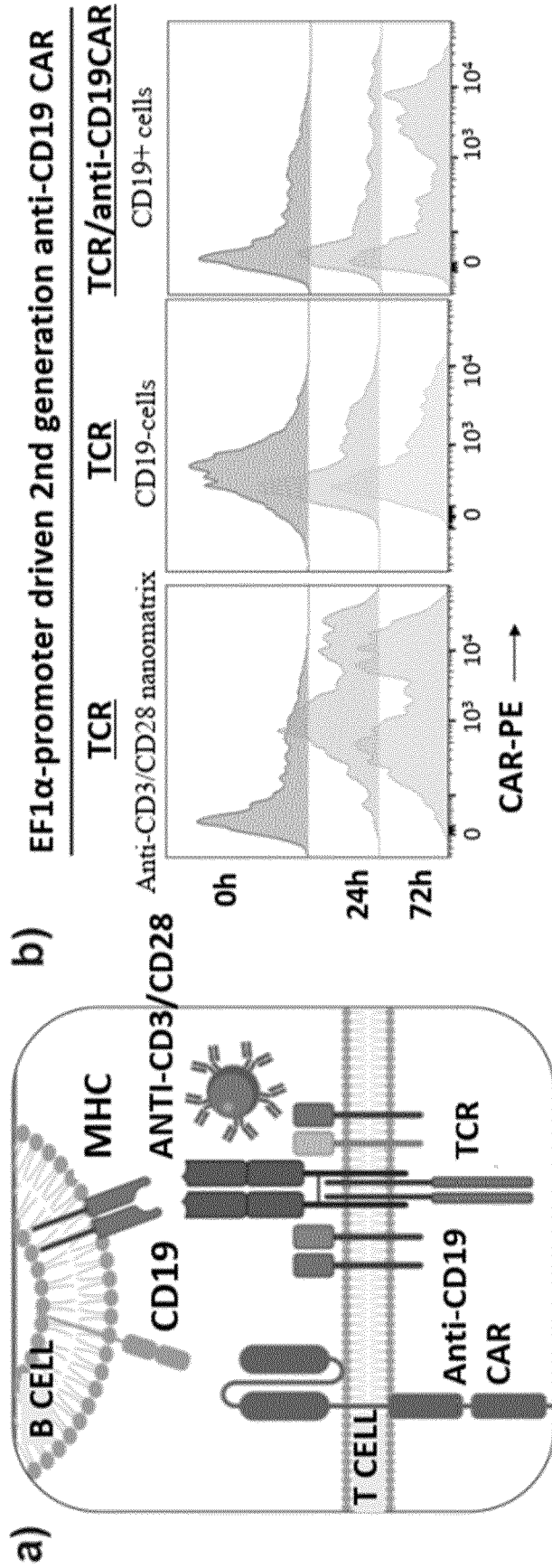


FIG. 7

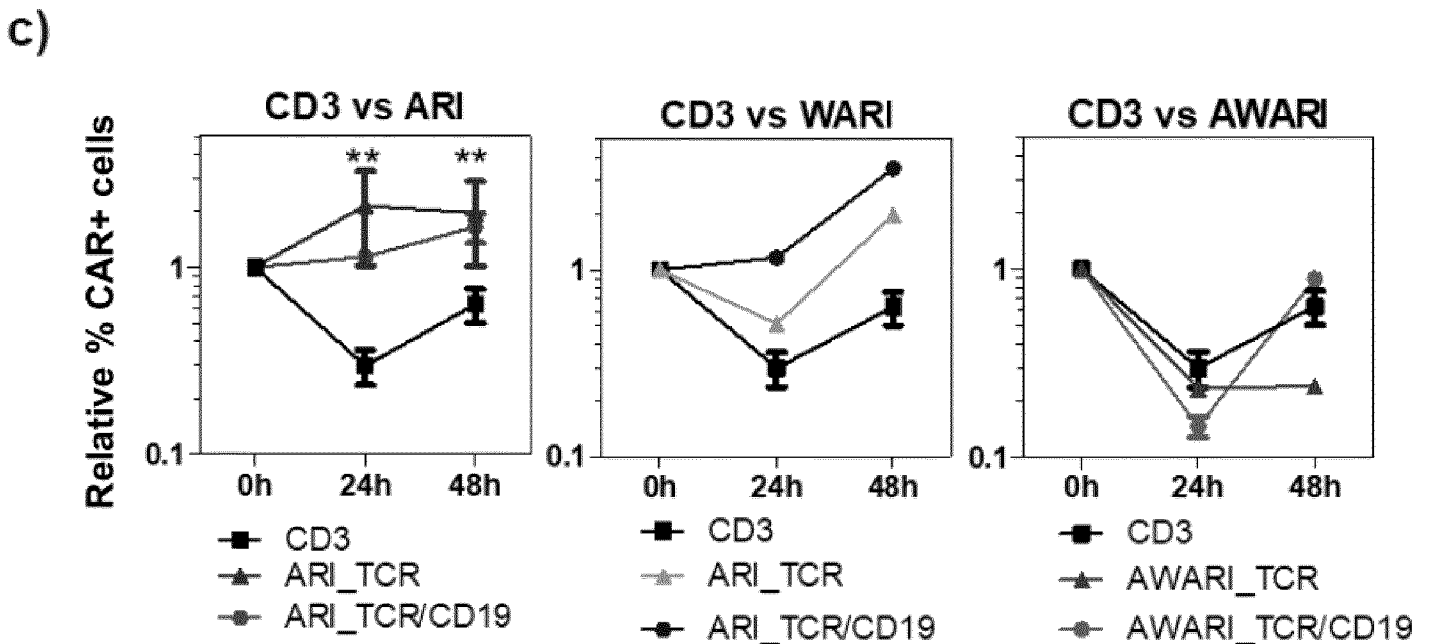
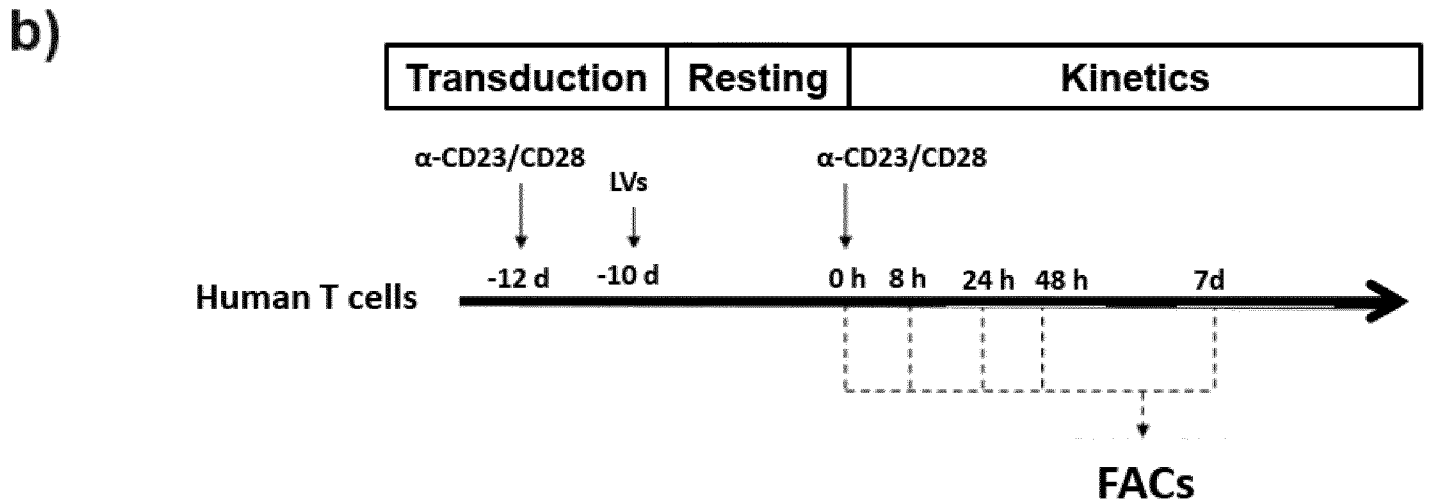
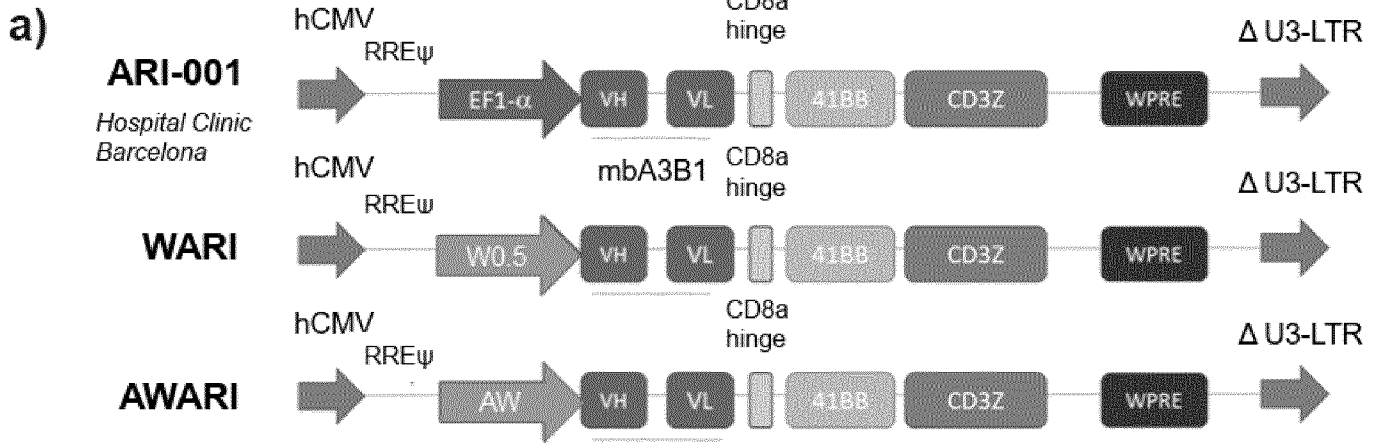


FIG. 8

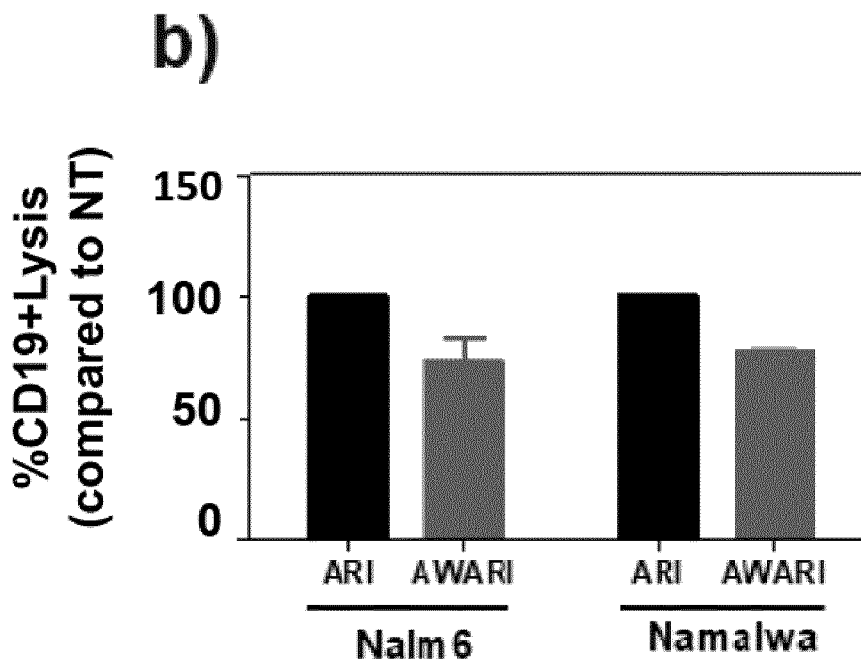
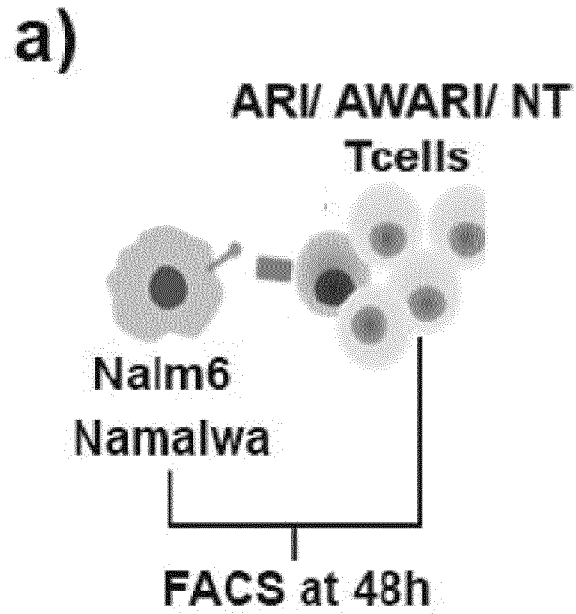
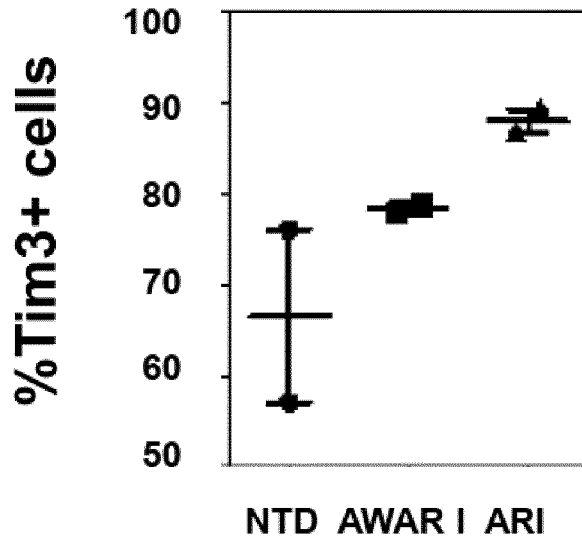


FIG. 9

c)

Exhaustion



d)

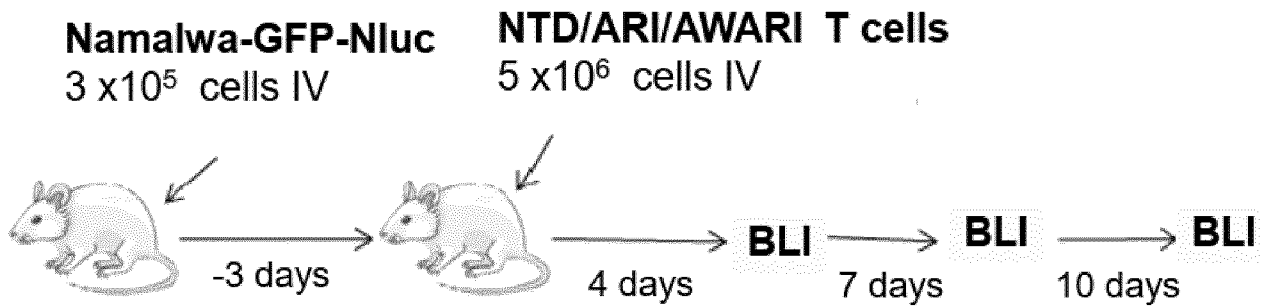


FIG. 9 (CONTINUE)

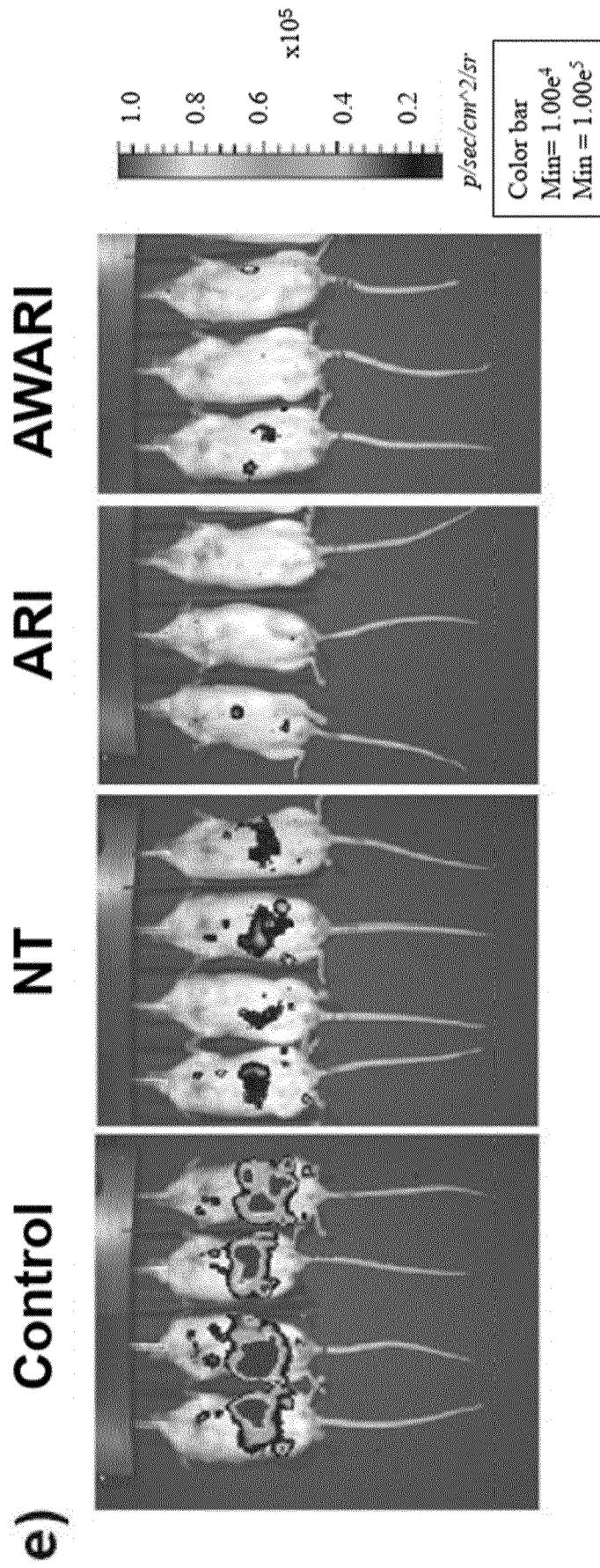
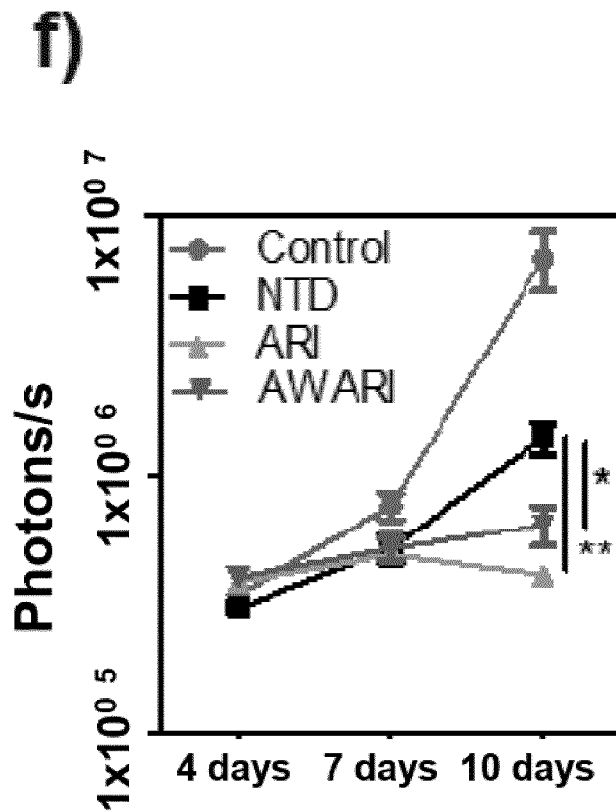


FIG. 9 (continue)



g) Sacrifice (day 15 post-T-infusion)

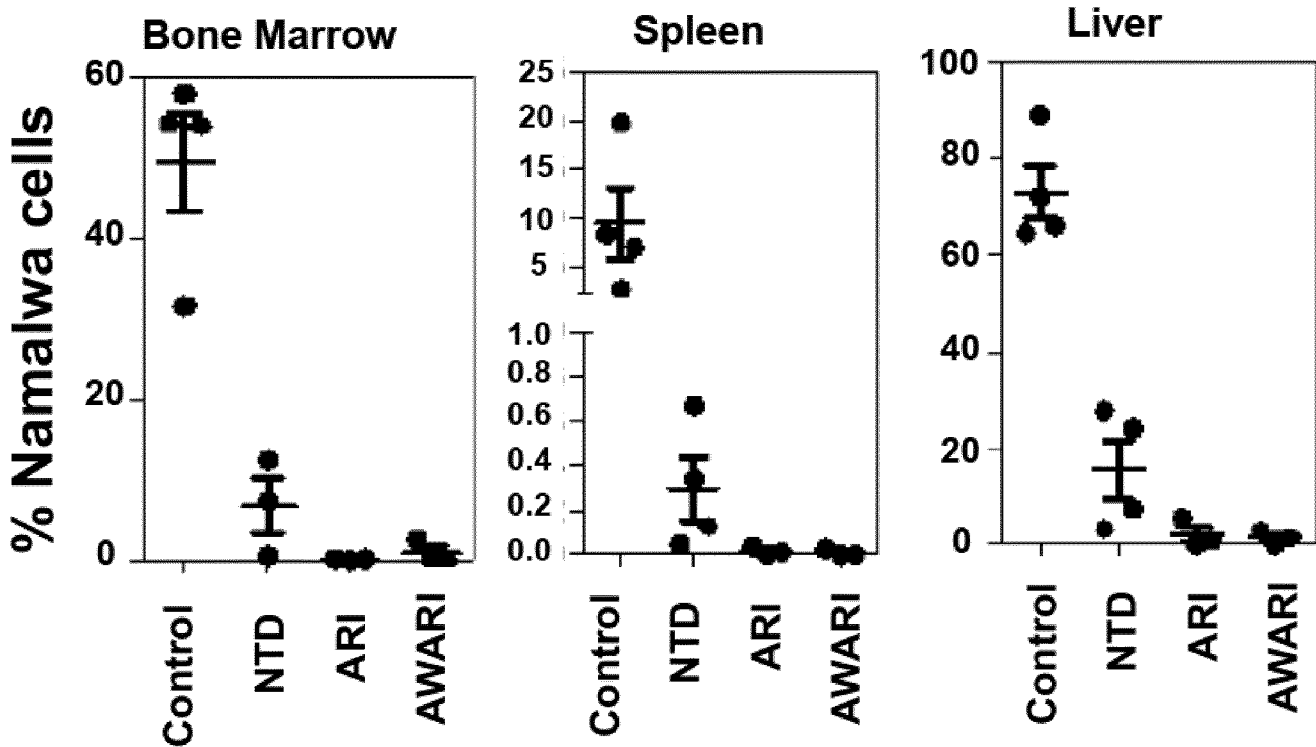


FIG. 9 (continue)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/081346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K14/725 C12N5/0783 C12N15/86
ADD.
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)
A61P C12N C07K
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)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUSTIN EYQUEM ET AL: "Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection", NATURE, vol. 543, no. 7643, 22 February 2017 (2017-02-22), pages 113-117, XP055397283, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature21405 the whole document	1,2,4-13
A	WO 2013/144409 A2 (FUNDACION PUBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD [ES] ET AL.) 3 October 2013 (2013-10-03) claims 1-18	1-13
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent 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 such 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 13 February 2020	Date of mailing of the international search report 24/02/2020
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Irion, Andrea
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/081346

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>M G TOSCANO ET AL: "Physiological and tissue-specific vectors for treatment of inherited diseases", GENE THERAPY, vol. 18, no. 2, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 117-127, XP55088392, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2010.138 table 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
A,P	<p>TRISTAN-MANZANO M ET AL: "LVs development for a fine-tuned regulation of CARs in T cells", HUMAN GENE THERAPY, vol. 30, no. 11, 1 November 2019 (2019-11-01), pages A71-A72, XP009518862, & ESGCT 27TH ANNUAL CONGRESS IN COLLABORATION WITH SETGYC MEETING; BARCELONA, SPAIN; OCTOBER 22 -25, 2019 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members


















International application No

PCT/EP2019/081346

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013144409	A2	NONE	03-10-2013

[Comment on this paper](#)

Physiological (TCR-like) regulated lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells

 María Tristán-Manzano,  Noelia Maldonado-Pérez,  Pedro Justicia-Lirio,  Pilar Muñoz,  Marina Cortijo-Gutiérrez,  Kristina Pavlovic,  Rosario Jiménez-Moreno,  Sonia Nogueras,  MDolores Carmona,  Sabina Sánchez-Hernández,  Araceli Aguilar-González,  María Castilla,  Manel Juan,  Concepción Marañón,  Karim Benabdellah,  Concha Herrera,  Francisco Martin

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.17.21253300>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?]. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should not be used to guide clinical practice.

ABSTRACT

Background Chimeric antigen receptor (CAR) T cells directed against CD19 have achieved impressive outcomes for the treatment of relapsed/refractory B lineage lymphoid neoplasms. However, CAR-T therapy still has important limitations due to severe side effects and the lack of efficiency in 40-50% of the patients. Most CARs-T products are generated using retroviral vectors with strong promoters. However, high CAR expression levels can lead to tonic signalling, premature exhaustion and overstimulation of CAR-T cells, reducing efficacy and increasing side effects. TCR-like expression of the CAR through genome editing resulted in enhanced anti-tumour potency, reducing tonic signalling and improving CAR-T phenotype. In this manuscript, we searched for LVs that mimic the TCR expression pattern as a closer-to-clinic alternative for the generation of improved CAR-T cells.

Methods Different LVs containing viral and human promoters were analysed to select those that closely mimic a TCR-like kinetic profile upon T-cell activation. *WAS* gene proximal promoter-driven LVs (AW-LVs) were selected to express a second generation 4-1BB αCD19 CAR (ARI-0001) into T cells to generate AWARI CAR-T cells. TCR-like AWARI and EF1α-driven ARI CAR T cells were analysed for *in vitro* and *in vivo* killing efficiency using leukaemia and lymphoma cellular models. Tonic signalling, exhaustion markers and phenotype were determined by flow cytometry. Large-scale automated manufacturing of AWARI CAR-T cells was performed in a CliniMACs Prodigy bioreactor.

Results Our data showed that LVs expressing the transgene through the *WAS* gene proximal promoter mimic very closely the TCR (CD3) expression pattern kinetic upon TCR stimulation or antigen encounter. Compared to EF1α-driven ARI CAR-T cells, AWARI CAR-T cells exhibited a higher proportion of naïve/stem cell memory T cells with less exhausted phenotype after efficient killing of CD19+ cells both *in vitro* and *in vivo*. AWARI CAR-T cells also showed lower tonic signalling and reduced secretion of pro-inflammatory cytokines and were efficiently manufactured in large-scale GMP-like conditions.

Conclusions *WAS*-gene-promoter driven LVs can be used to generate physiological 4-1BB-CAR-T cell products with lower tonic signalling, improved phenotype and a safer profile. We propose the use of TCR-like LVs as an alternative to strong-promoter driven LVs for the generation of CAR-T products.

WAS Promoter-Driven Lentiviral Vectors Mimic Closely the Lopsided WASP Expression during Megakaryocytic Differentiation

Pilar Muñoz,^{1,2,5} María Tristán-Manzano,^{1,5} Almudena Sánchez-Gilabert,^{1,5,6} Giorgia Santilli,² Anne Galy,^{3,4} Adrian J. Thrasher,² and Francisco Martin¹

¹Genomic Medicine Department, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud (PTS), Avenida de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain; ²University College London (UCL) Great Ormond Street Institute of Child Health (ICH), 30 Guilford Street, WC1N 1EH London, UK; ³Genethon, 91000 Evry, France; ⁴Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Genethon, Intégrare research unit UMR_S951, 91000 Evry, France

ABSTRACT

Transplant of gene-modified autologous hematopoietic progenitor cells has emerged as a new therapeutic approach for Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), a primary immunodeficiency with microthrombocytopenia and abnormal lymphoid and myeloid functions. Despite the clinical benefits obtained in ongoing clinical trials, platelet restoration is suboptimal. The incomplete restoration of platelets in these patients can be explained either by a low number of corrected cells or by insufficient or inadequate WASP expression during megakaryocyte differentiation and/or in platelets. We therefore used *in vitro* models to study the endogenous WASP expression pattern during megakaryocytic differentiation and compared it with the expression profiles achieved by different therapeutic lentiviral vectors (LVs) driving WAS cDNA through different regions of the WAS promoter. Our data showed that all WAS promoter-driven LVs mimic very closely the endogenous WAS expression kinetic during megakaryocytic differentiation. However, LVs harboring the full-length (1.6-kb) WAS-proximal promoter (WW1.6) or a combination of the WAS alternative and proximal promoters (named AW) had the best behavior. Finally, all WAS-driven LVs restored the WAS knockout (WASKO) mice phenotype and functional defects of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) from a WAS patient with similar efficiency. In summary, our data back up the use of WW1.6 and AW LVs as physiological gene transfer tools for WAS therapy.