

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL
TRATAMIENTO INMUNOLÓGICO**

Autor:

Luis Comenge León

Tutor:

Enrique Martínez Carretero

Convocatoria:

Julio 2020

Resumen

La inmunología es una rama de la medicina que está teniendo grandes resultados, que se traducen en notables aumentos de la calidad y esperanza de vida de los pacientes. Los avances recientes en este campo se utilizan con éxito en terapias que modulan el sistema inmune para combatir diversas enfermedades graves.

Las inmunoterapias dirigidas a los tumores sólidos presentan una serie de dificultades relacionadas con: la capacidad de acceder al tumor, su infiltración y citotoxicidad.

Por otro lado, las células tumorales muestran una serie de mecanismos que les permiten evadir o modificar la respuesta inmune frente al tumor como son: la expresión de ligandos que interaccionan con receptores de las células-T(PD-L1); dificultar la presentación antigénica; y generar microambientes que impidan la acción de las T citotóxicas.

Con respecto a las nuevas terapias, las células T-CAR están en desarrollo por diferentes grupos de investigación, prueba de ello es el gran número de estudios que se están realizando en este momento y las nuevas generaciones células T-CAR propuestas en la bibliografía.

En el presente trabajo se ha realizado una revisión de las estrategias actuales en inmunoterapias. Centrando el trabajo en una terapia celular adoptivas denominada células T-CAR.

Palabras clave

Inmunoterapia, cáncer, células T-CAR, linfocitos, tumor.

Abstract

Immunology is a branch of medicine that is having great results, which translate into significant increases in the quality and life expectancy of patients. Recent advances in this field are successfully using therapies that modulate the immune system to combat various serious diseases. Immunotherapies aimed at solid tumors present a series of difficulties related to: the ability to access the tumor, infiltration into the tumor and its cytotoxicity.

On the other hand, tumor cells show a series of mechanisms that allow them to evade or modify the immune response to the tumor, such as: the expression of ligands that interact with T-cell receptors (PD-L1), making antigenic presentation difficult, and generating microenvironments that prevent the action of cytotoxic Ts (pH, oxygen, among others).

With respect to new therapies, the CAR-T cells are being developed by different research groups, proof of which is the large number of clinical trials currently being carried out and the new generations of CAR-T cells proposed in the literature.

In the present work a review of the strategies in immunotherapies has been carried out. Focusing the work in an adoptive cell therapy called CAR-T cells.

Key Words

Immunotherapy, cancer, CAR T cells, lymphocytes, tumor.

Abreviaturas

| | |
|--------------------|---|
| AAV-cpf1 | <i>Adeno-associated virus-Cpf1</i> |
| APC | Células presentadoras de antígeno |
| BCR | Receptores de células B |
| CAR | Receptor de antígeno quimérico |
| CASC | Células estromales asociadas al cáncer |
| CRISPR/cas9 | <i>sgRNA-guided clustered regularly interspaced short palindrome repeats-associated nuclease Cas9</i> |
| CSSD | Dominios de señalización coestimuladores intracelulares |
| CTLA-4 | <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| ERLD | Dominio de reconocimiento ligado al antígeno extracelular |
| FAP | Proteína de activación de fibroblastos |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| ICOS | Coestimulador inducible de células T |
| IFN | Interferón |
| ITAM | <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| LAG3 | <i>Lymphocyte-activation gene 3</i> |
| MEC | Matriz extracelular |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| MSDC | Células supresoras derivadas de mieloides |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| PD-L1 | Ligando de muerte programada |

| | |
|----------------|--|
| PPRs | Receptores de reconocimiento de patrones |
| scFV | Fragmento variable extracelular de cadena sencilla |
| TAA | Antígenos asociados a tumores |
| TAN CAR | Células CAR en tandem |
| TCR | Receptores de células T |
| Tfh | Linfocito T folicular |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante β |
| TLR | <i>Toll like receptor</i> |
| TME | Microambiente tumoral |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TRAIL | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> |
| Treg | Linfocito T regulador |
| TRUCKS | <i>T cells redirected for universal cytokine killing</i> |
| UNI-CAR | Células CAR universales |
| VEGFR2 | Factor de crecimiento endotelial vacular tipo 2 |

Índice

| | |
|--|---------------|
| Resumen | - 2 - |
| Palabras clave | - 2 - |
| Abstract | - 3 - |
| Key Words | - 3 - |
| Abreviaturas | - 4 - |
| 1. Introducción | - 7 - |
| 1.1. El sistema inmune y sus componentes | - 7 - |
| 1.1.1. Linfocitos T | - 9 - |
| 1.1.2. Receptores de inhibición de respuesta inmune | - 10 - |
| 1.2. Inmunoterapia | - 11 - |
| 1.2.1 Terapia celular adoptiva | - 12 - |
| 2. Objetivos | - 15 - |
| 3. Material y Métodos | - 15 - |
| 4. Resultados y Discusión | - 15 - |
| 4.1. Inconvenientes de las células T-CAR | - 15 - |
| 4.2. Mejora del reconocimiento de antígeno de células T-CAR | - 17 - |
| 4.3. Optimización del dominio de señalización coestimulador | - 18 - |
| 4.4. Expresión de citoquinas transgénicas | - 19 - |
| 4.5. Atracción de células T-CAR al tumor | - 20 - |
| 4.6. Remodelación del microambiente tumoral | - 21 - |
| 4.6.1. Acción contra receptores inhibidores | - 22 - |
| 5. Conclusión | - 23 - |
| 6. Referencias | - 24 - |

1. Introducción

1.1. El sistema inmune y sus componentes

El sistema inmunitario (SI) se compone de células y moléculas responsables de la inmunidad de nuestro organismo. Se diferencia en dos partes: aquella conocida como inmunidad innata, que actúa de forma inmediata frente a microbios y células dañadas, a partir de barreras primarias, fagocitos y células dendríticas; y otra denominada inmunidad adaptativa, cuyas características centrales se basan en la selección clonal y el desarrollo de la función inmune específica de antígeno, cuyas células principales son los linfocitos T y B (1,2,3).

Las células integrantes del sistema inmune innato expresan una serie de receptores especializados en la detección de patógenos tales como bacterias o virus, que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). De entre ellos, destacan los involucrados en procesos de eliminación y fagocitosis, inducción de la inflamación y producción de citoquinas (p.ej.: TLR, del inglés, *Toll Like Receptor*) (4). Por otra parte, cada una de las células que integran el sistema inmune adaptativo posee receptores únicos, diferentes de unas células a otras; lo que hace posible la alta especificidad de este sistema frente a diferentes infecciones y enfermedades, son los llamados receptores de células B (BCR) y receptores de células T (TCR). Sin embargo, para activar a los linfocitos, es necesario la participación de las células presentadoras de antígeno (APC); que muestran los antígenos a través de un complejo de proteínas conocido como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que se divide en clase 1 y clase 2, y se expresan tanto por células nucleadas, como por células dendríticas (DC), linfocitos B, macrófagos y algunos otros tipos celulares, respectivamente (5).

La generación, ejecución y regulación de la respuesta inmunitaria sería ineficaz en ausencia de un sistema de comunicación entre células. Esta señalización necesita de unos mensajeros llamados citocinas, que son secretadas por células del sistema inmune y otros tejidos. Son proteínas de bajo peso molecular que se agrupan en base a su función, composición y el tipo de receptor que reconocen (**Tabla 1**) (6).

Tabla 1. Citocinas y efectos biológicos.

| <i>CITOCINA</i> | <i>FUENTE CELULAR</i> | <i>EFEECTO BIOLÓGICO</i> |
|--|-----------------------------------|---|
| <i>IL-2</i> | Linfocitos T | -Proliferación de linfocitos T, B y NK |
| <i>IL-3</i> | Linfocitos T | -Maduración líneas hematopoyéticas |
| <i>IL-4</i> | Linfocitos T | -Diferenciación linfocitos Th2 -Activación de macrófagos por vía alternativa e inhibición de vía clásica -Cambio isotipo anticuerpo IgE |
| <i>IL-5</i> | Linfocitos T | -Activación de eosinófilos |
| <i>IL-6</i> | Macrófagos | -Proliferación linfocitos B |
| <i>IL-12</i> | Macrófagos | -Diferenciación linfocitos T -Citotoxicidad linfocitos T y NK -Síntesis de IFN- γ |
| <i>IL-13</i> | Linfocitos T | -Activación alternativa de macrófagos |
| <i>IL-25</i> | Linfocitos T | -Expresión de IL-4, IL-5, IL-13 |
| <i>IL-27</i> | Macrófagos | -Inhibición linfocitos Th1 |
| <i>IFN- γ</i> | Linfocitos T | -Funciones microbicidas macrófagos -Cambio isotipo anticuerpo IgG -Mayor expresión moléculas clase 1 y 2 del MHC |
| <i>IFN- α</i> <i>IFN-β</i> | Macrófagos Células Dendríticas | -Activación linfocitos NK -Respuesta antivírica |
| <i>TNF</i> | Macrófagos Linfocitos T, NK | -Activación de neutrófilos -Hipotálamo: fiebre -Músculo, grasa: catabolismo |

En la siguiente tabla se citan algunas de las interleuquinas de mayor relevancia en el SI, así como las células que la producen y el efecto que desarrollan; NK = Natural Killer, Th1 = linfocito T helper tipo 1. Th2 = linfocito T helper tipo 2. IgE = inmunoglobulina de tipo E; (1)

Los anticuerpos, son otras proteínas muy importantes del SI. Están fabricados a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras de forma idéntica, hecho por el cual se les acuña el término genérico de inmunoglobulinas. Ambas cadenas constan a su vez de regiones variables (V) y regiones constantes (C), que participan en el reconocimiento antigénico y en funciones protectoras o efectoras, respectivamente.

Los anticuerpos se dividen en 5 isotipos en función de las diferencias en la estructura de las regiones C de la cadena pesada. Se denominan IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada isotipo desarrolla acciones diferentes, aunque de forma general, las funciones básicas son: neutralización, opsonización, activación del complemento y linfocitos NK (1,7).

1.1.1. Linfocitos T

Los linfocitos T son células provenientes de la línea linfoide hematopoyética. Su alta especificidad se basa en que, junto con los linfocitos B, son las únicas células del organismo con capacidad de expresar receptores para un determinado antígeno distribuidos de forma clonal (es decir, tras sufrir una modificación en su genoma) (1,5).

La maduración de los linfocitos T se lleva a cabo en el timo, órgano linfoide desde donde las células T *naive* inactivadas, se distribuyen hacia el torrente circulatorio en busca de su antígeno específico. Cuando se produce la presentación antigénica por medio de las células APC a través de los complejos péptidos al TCR, se produce la selección clonal de la célula T, la expansión del clon y su diferenciación a células T efectoras, y le confiere una función específica (**Tabla 2**) (1,3).

Tabla 2. Clases de células efectoras, funciones y especificidad.

| CÉLULA EFECTORA | LINFOCITO T CD8+ | LINFOCITO T CD4+ | LINFOCITO Treg | LINFOCITO NK | | | | | | | | |
|------------------------|---|---|-----------------------|---|------------|---|-------------|---|------------|---|---|--|
| FUNCIÓNES | Muerte de células infectadas por virus Actividad antitumoral | <table border="1"> <tr> <td>Th1</td> <td>Estimulación de fagocitos contra patógenos intercelulares</td> </tr> <tr> <td>Th2</td> <td>Estimulación de reacciones mediadas por IgE y eosinófilos contra patógenos extracelulares</td> </tr> <tr> <td>Th17</td> <td>Mediación de reacciones inflamatorias autoinmunes Acción protectora frente infecciones bacterianas</td> </tr> <tr> <td>Tfh</td> <td>Activación de linfocitos B para inducción de Ig, cambio de isotipo y generación de células plasmáticas de vida larga.</td> </tr> </table> | Th1 | Estimulación de fagocitos contra patógenos intercelulares | Th2 | Estimulación de reacciones mediadas por IgE y eosinófilos contra patógenos extracelulares | Th17 | Mediación de reacciones inflamatorias autoinmunes Acción protectora frente infecciones bacterianas | Tfh | Activación de linfocitos B para inducción de Ig, cambio de isotipo y generación de células plasmáticas de vida larga. | Regulación inmunitarias Mantenimiento de tolerancia frente a lo propio | Supresión o activación de respuestas innatas y/o adaptativas |
| Th1 | Estimulación de fagocitos contra patógenos intercelulares | | | | | | | | | | | |
| Th2 | Estimulación de reacciones mediadas por IgE y eosinófilos contra patógenos extracelulares | | | | | | | | | | | |
| Th17 | Mediación de reacciones inflamatorias autoinmunes Acción protectora frente infecciones bacterianas | | | | | | | | | | | |
| Tfh | Activación de linfocitos B para inducción de Ig, cambio de isotipo y generación de células plasmáticas de vida larga. | | | | | | | | | | | |
| ESPECIFICIDAD | Moléculas MHC 1 | Moléculas MHC 2 | Moléculas MHC 2 | Complejo glucolípidido-CD1 | | | | | | | | |

Tfh: linfocito T follicular. *Treg*: linfocito T regulador. *CD8+* = linfocito T citotóxico. *CD4+* = linfocito T cooperador. *Ig* = inmunoglobulina. (1,3,7)

En general, para que estas células generen una respuesta productiva requieren tres señales básicas: la presentación del antígeno mediante el complejo péptido MHC; potentes señales de estimulación; y citocinas solubles que promuevan factores de

crecimiento y diferenciación (8). Por tanto, la activación de las células T se lleva a cabo a partir de señales de respuesta de la unión TCR-MHC + antígeno, y de una serie de receptores coestimuladores (**Figura 1**). En cuanto a su diferenciación, se ven influenciadas por señales adicionales del entorno dando lugar a las diferentes células efectoras ya descritas anteriormente (9).

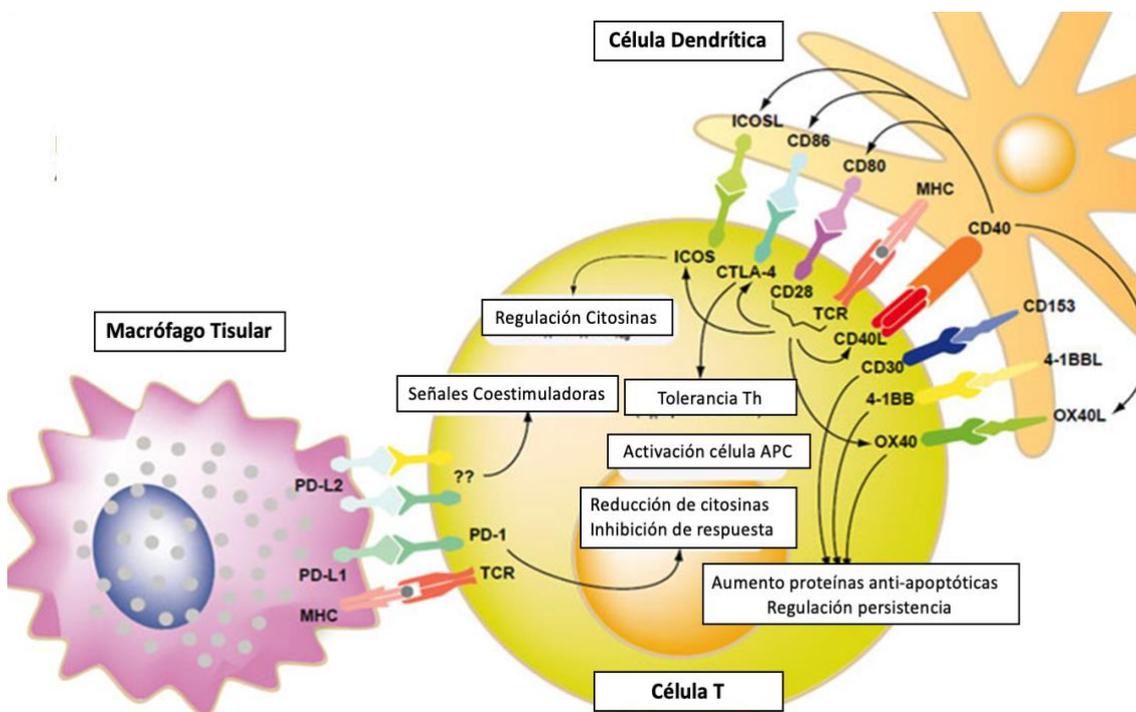


Figura 1. Vías de control inmunitario. Para que una célula T normal se active, necesita como mínimo que se produzcan las uniones del complejo TCR y de los receptores coestimuladores (ICOS, CD28, 4-1BB, OX40) con sus ligandos correspondientes durante la presentación antigénica. Una vez realizado el reconocimiento, se generan diferentes cascadas de señalización intracelular para cada uno de los receptores coestimuladores lleve a cabo la función que desempeñan; Desde el momento que uno de los receptores no reconozca a su ligando, o que se activen los receptores inhibitorios de respuesta (PD-1, CTLA-4), la célula T no se podrá activar (10).

1.1.2. Receptores de inhibición de respuesta inmune

Al igual que existen una serie de receptores activadores, también aparecen aquellos que impiden la activación de los linfocitos T, son los receptores inhibidores de respuesta que pueden ser expresados por células tumorales. El crecimiento y supervivencia de tejidos tumorales, involucra una interacción entre las células cancerosas y los mecanismos de defensa del huésped, este proceso se conoce como microambiente tumoral (TME, del inglés *tumor microenvironment*) (11, 12).

El principal mecanismo de protección inmunitaria adaptativa frente a los tumores reside en la muerte de las células tumorales mediado por los linfocitos CD8+ y células

asesinas naturales (NK). Sin embargo, la capacidad antitumoral de estas células inmunes se ve damnificada a través de diferentes mecanismos de evasión tumoral (**Figura 2**) (13).

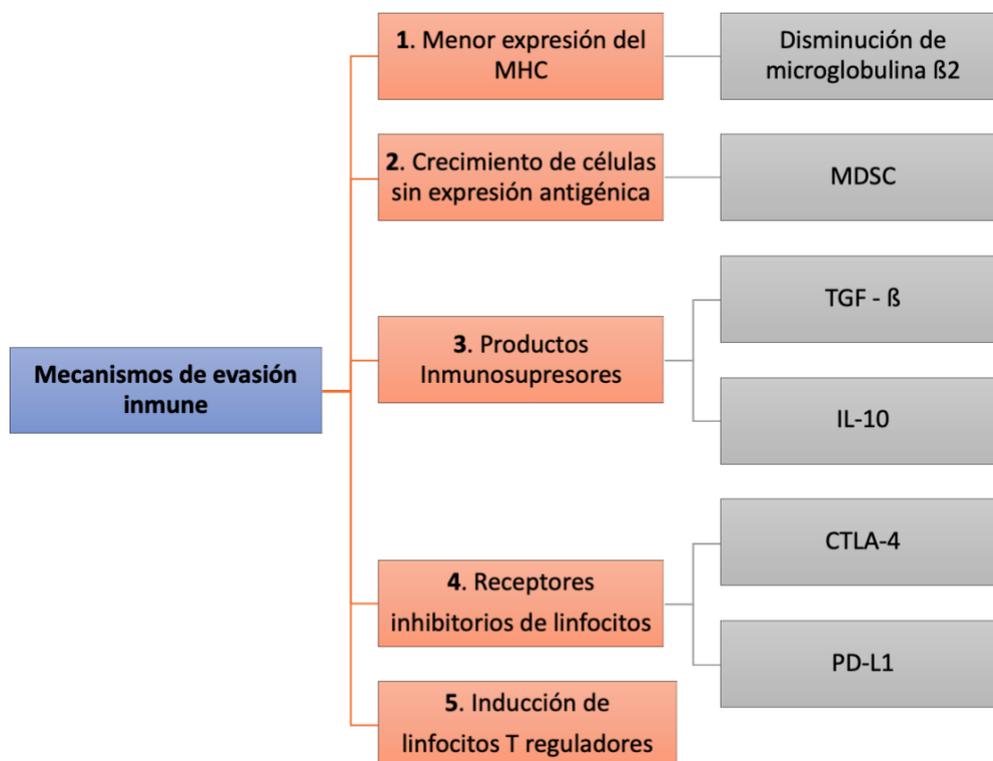


Figura 2. Mecanismos de evasión inmune. 1) La disminución de componentes que conforman el complejo péptico del MHC de las células tumorales evita el reconocimiento de antígenos en su superficie. 2) La presencia de MDSCs se correlaciona con respuestas inmunitarias antitumorales 3) La supresión inmunitaria a través de productos secretados por células tumorales se centran en inhibir la proliferación y funciones efectoras de los linfocitos y macrófagos. 4) Los tumores evaden las respuestas antitumorales de las células T mediante la activación de moléculas inhibitorias, evitando la citólisis de las células CD8+. 5) Las células tumorales aumentan la población de células Treg infiltrándolas en el tumor para utilizar sus funciones de regulación inmunitaria a su favor; *MDSC*: células supresoras derivadas de mieloides. *TGF-β*: factor de crecimiento transformante beta. *CTLA-4*: antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico. *PD-L1*: ligando 1 de muerte programada. (1),(11),(13,14,15).

1.2. Inmunoterapia

La definición de inmunoterapia comprende el tratamiento de una enfermedad con sustancias terapéuticas que promueven o inhiben las respuestas inmunitarias. Este concepto se integra dentro de un grupo mayor denominado terapia biológica, basado en la premisa de obtención de sustancias a partir de organismos vivos producidas en el laboratorio con fines terapéuticos (16,17). En la **tabla 3** se muestran diferentes tipos de inmunoterapia utilizados en la actualidad, y sus aplicaciones.

Tabla 3. Clasificación de Inmunoterapias y Aplicaciones.

| <i>INMUNOTERAPIA</i> | | <i>APLICACIONES</i> |
|---|--|---|
| <i>Anticuerpos</i> | Enfermedades Autoinmunes | -Artritis reumatoide o psoriásica -EII -Lupus eritematoso sistémico |
| | Terapia Antitumoral | -Melanomas y mielomas múltiples -Cáncer de mama |
| | Trasplantes | -Rechazo agudo o crónico post-injerto |
| | Enfermedades Alérgicas | -Asma |
| | Asociación con fármacos | -Citostáticos en quimioterapia -Antibióticos contra <i>Clostridium difficile</i> |
| <i>Vacunas</i> | Preventivas | -SIDA -Tuberculosis (Bacilo BCG) |
| | Modificadas | -Potenciación del Sistema Inmune |
| | Antitumorales | -Cáncer de próstata (<i>Sipuleucel-T</i>) -Cáncer de pulmón no microcítico -Carcinoma colorrectal y de vejiga |
| <i>Citocinas Inmunomoduladoras</i> | TNF- α, IL-12, IFN- α, IFN- γ | -Mieloma múltiple -Carcinoma de células renales -Infecciones bacterianas: Neumonía por klebsiella -Infecciones parasitarias: Malaria |
| <i>Terapia Celular Adoptiva</i> | Receptor de antígeno quimérico (CAR) | -Leucemia linfoblástica aguda -Enfermedades Autoinmunes |
| | Linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) | -Leucemia linfocítica crónica -Cáncer de mama metastático |

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal. BCG: Bacilo Calmette-Guérin. TNF: factor necrosis tumoral. IFN: interferón. IL: interleuquina. Información obtenida de (12), (16), (18-19).

1.2.1 Terapia celular adoptiva

Las inmunoterapias se han convertido en el pilar fundamental del tratamiento contra el cáncer. Entre ellas, destaca la inmunoterapia celular adoptiva de las células T del receptor de antígeno quimérico (CAR), que tiene como objetivo redirigir los linfocitos T citotóxicos (CD8+) contra antígenos expresados en células tumorales.

El procedimiento de obtención de estas células comienza con un previo aislamiento de células T de la sangre periférica del paciente o de un donante sano, en el laboratorio se inoculan los genes CAR para generar las células T-CAR, que se expandirán *in vitro* para finalmente administrarlas nuevamente al paciente (8) (**Figura 3**).

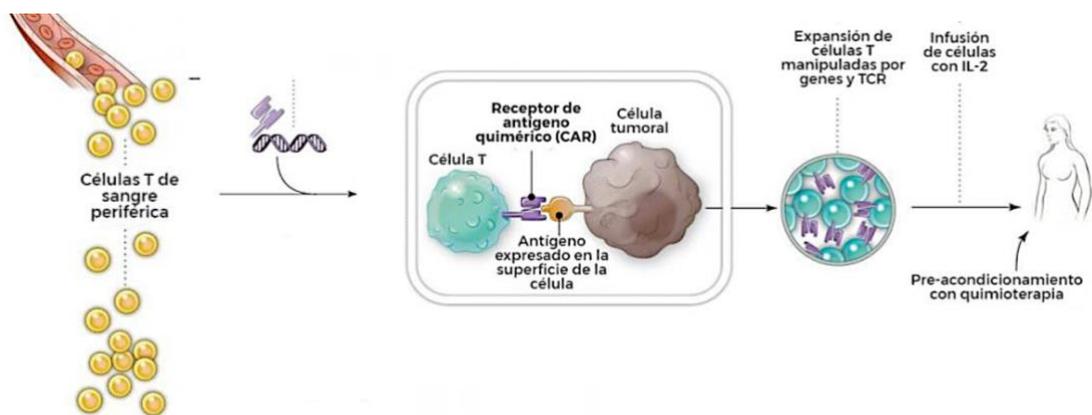


Figura 3. Proceso de obtención de células T-CAR. Antes obtener las células T del paciente, es necesario llevar a cabo una selección de los individuos candidatos a la terapia CAR (como pacientes de alto riesgo que no respondan a la quimioterapia). Además, es importante realizar el pre acondicionamiento con quimioterapia en el hospedador, con el fin de eliminar los linfocitos T existentes para evitar complicaciones tras el trasplante (enfermedad de injerto contra el huésped). Adaptado de (16).

Un CAR generalmente, se compone de un fragmento variable extracelular de cadena sencilla (scFV), fusionado a través de un dominio transmembrana a dominios de señalización coestimuladora intracelular (CSSD). Cuando tiene lugar el reconocimiento antigénico por parte del scFv, se produce la activación del dominio de señalización coestimulador, generando la estimulación y proliferación posterior de células T, que eliminarán mediante citólisis y liberación de citocinas las células tumorales (20,21).

Existen 3 generaciones diferentes de células CAR T en función de la región intracelular (**Figura 4**). Los CAR de primera generación están compuestos de un solo dominio de señalización intracelular, CD3 ζ . Por el contrario, tanto los CAR de segunda como tercera generación utilizan los CAR de primera generación como base e incorporan uno o dos dominios de señalización coestimuladores adicionales, cuyas funciones se describirán más adelante (22).

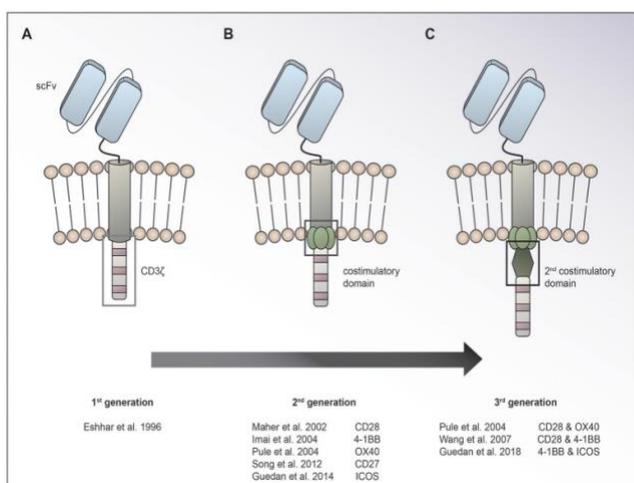


Figura 4. Evolución del diseño de células T-CAR. A diferencia de los TCR, los CAR reconocen objetivos de superficie específicos en las células tumorales evitando eficazmente el escape inmune; los dominios de señalización coestimulador intracelular representan una variedad de combinaciones de receptores que permiten mejorar la proliferación, persistencia y función efectora de las células T-CAR; Una de las principales ventajas con respecto a las células T normales se refleja en la posibilidad de insertar el dominio coestimulador que se necesita, para el cual es solamente necesario el reconocimiento del antígeno por parte de ese dominio para llevar a cabo la activación (23).

La activación eficiente de las células CAR no solo va a depender de la propia función de los CSSD, sino también del reconocimiento adecuado del antígeno, que corresponde al dominio de reconocimiento ligado al antígeno extracelular (**Figura 5**). De esta manera, se identifican las células diana, pero es necesaria una cantidad suficiente del antígeno para dar lugar a la acción. Además, en estas condiciones se pueden originar efectos fuera del tumor relacionados con el reconocimiento de células normales no malignas por parte de los CAR, debido a que pueden expresar el mismo antígeno diana. Por tanto, la selección del antígeno de forma adecuada es de vital importancia para el éxito de esta terapia (8).

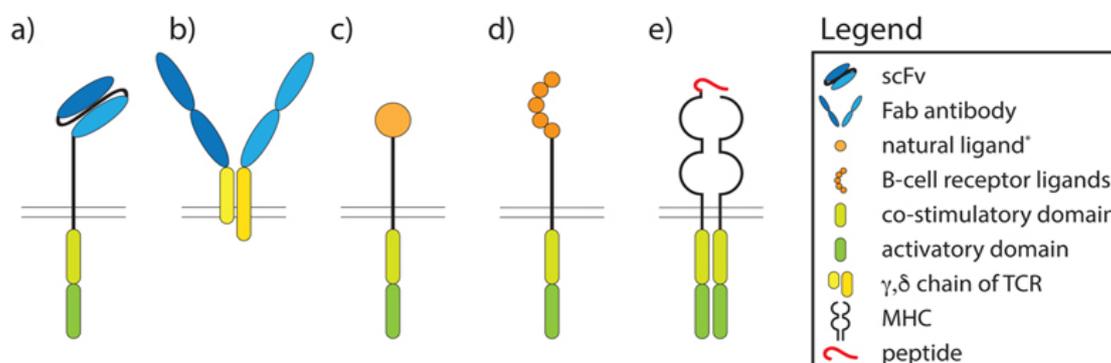


Figura 5. Dominios de reconocimiento de ligando extracelular de CAR. a) fragmentos de anticuerpos variables de dominio único, son los más utilizados en la actualidad, consisten en la unión de la región de la cadena variable del anticuerpo con la cadena pesada del mismo, mediante un conector de naturaleza peptídica b) fragmento de unión a antígeno (Fab). La agrupación de estos fragmentos a regiones constantes TCR, confiere ventajas sobre los CAR clásicos, como la liberación reducida de citocinas relacionadas con un menor agotamiento de células T c) ligandos naturales, están fuertemente relacionados con la expresión de citocinas por parte de las células CAR, destinados a atacar el receptor particular de la citocina situada en la célula tumoral (p.ej.: IL-13 en glioblastoma) d) ligandos de receptores de células B, e) ligandos de receptores de células T (TCR); los dos últimos ELRD se encuentran actualmente en investigación en procesos autoinmunes. Imagen obtenida de (8),(24,25).

La inmunoterapia basada en las T-CAR ha provocado un rotundo éxito clínico en pacientes con leucemia o linfoma CD19 positivo. De hecho, en el mercado existen terapias aprobadas por la FDA y EMA; es el caso *Kymriah*® (tisagenlecleucel) y *Yescarta*® (axicabtagén ciloleucel), indicados para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda recurrente y para el linfoma de células B grandes o difíciles de tratar, respectivamente (20).

Sin embargo, la eficacia deseable de las células T-CAR no se ha logrado actualmente en tumores sólidos. Se plantean una variedad de desafíos donde se abarcan procesos de fabricación, inserción en el hospedador, heterogeneidad de acción, toxicidad, etc; para los cuales se han formulado una serie de estrategias de modificación génica prometedoras y que también serán revisadas en el presente trabajo (26).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica de nuevas inmunoterapias.

Se desarrollará un análisis de las ventajas e inconvenientes y posibles mejoras de alguna de esas terapias.

3. Material y Métodos

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica tanto en inglés como en castellano, utilizando las siguientes palabras clave en diferentes combinaciones: *immunotherapy, tumor, cáncer, CAR T cells y lymphocyte*". Se consideraron revisiones y artículos originales en inglés posteriores al año 2015. También se tuvieron en cuenta referencias citadas en los artículos seleccionados. Además, se revisaron los ensayos clínicos en marcha por medio de la base de datos <https://clinicaltrials.gov>.

Se utilizó el punto Q de la biblioteca de la Universidad de La Laguna para acceder a revistas, libros y a las siguientes bases de datos: PubMed, Scopus, y el catálogo de la biblioteca para consultar los libros que fueron necesarios a texto completo.

También se completó la revisión bibliográfica mediante el buscador Google visitando diferentes páginas webs legalmente verificadas y exentas de plagio.

4. Resultados y Discusión

4.1. Inconvenientes de las células T-CAR

Los altos costes de elaboración y largos ciclos de producción limitan la producción a gran escala de las células T-CAR; sin embargo el principal problema de la terapia celular adoptiva reside en la baja eficacia terapéutica frente a tumores sólidos. Ante estas situaciones, se producen una serie de factores limitantes que disminuyen la capacidad de activación de estas células (**Figura 6**) (20).

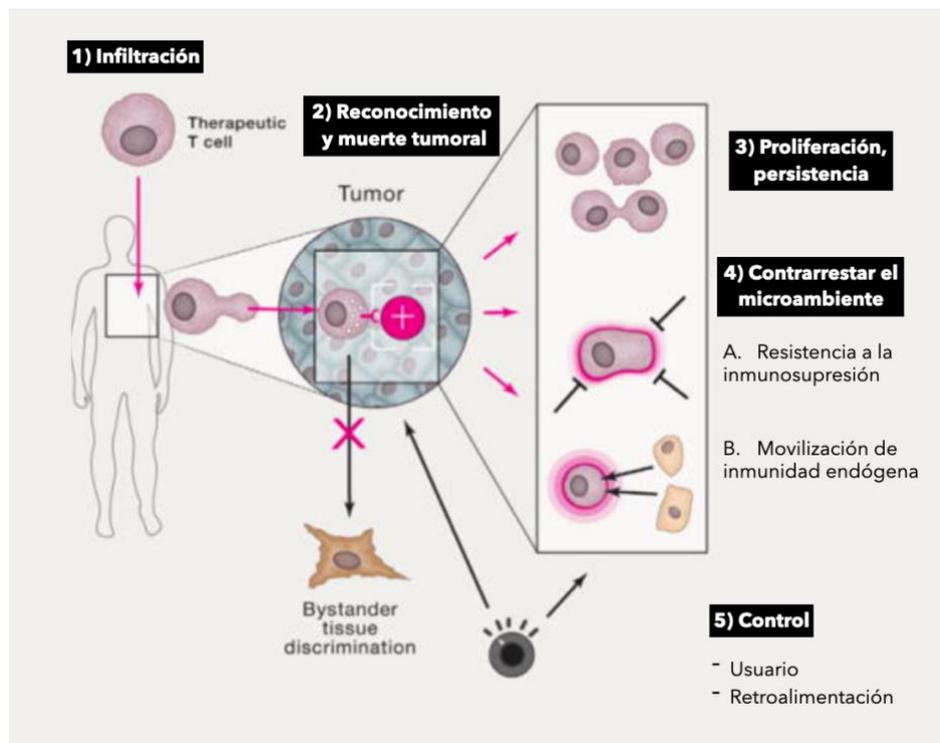


Figura 6. Factores limitantes del uso de células T-CAR en tumores sólidos. Adaptado de (23).

El primer paso para ejecutar la función de las T-CAR pasa por una buena infiltración hacia el tejido tumoral (20). Si bien el acceso no supone un inconveniente para los cánceres hematológicos, si supone un problema importante para tumores sólidos. Esto es debido a que estos últimos son más fibróticos y consecuentemente, más difíciles de penetrar. Además, se puede suprimir la señalización quimiotáctica que facilita infiltración (26).

La heterogeneidad antigénica en tumores sólidos disminuye en gran medida la acción de células T-CAR, que tienen capacidades de reconocimiento de un único antígeno por célula. También da lugar a la aparición de reacciones cruzadas, que producen la muerte de células no cancerosas de tejidos esenciales provocados por el ataque de células T-CAR (23,26).

La ausencia de dominios coestimuladores en la estructura general de las CAR que garanticen la supervivencia necesaria para eliminar el tumor, unido a la escasez en la producción de citocinas que inducen la proliferación celular, hace que disminuya su función citotóxica y se promueva su inactivación (21). La selección de moléculas coestimuladoras que garanticen el tiempo necesario de duración de la acción antitumoral supone un enfoque de investigación actual en la búsqueda de nuevas estrategias (26).

La presencia de los receptores de inhibición expresados por las células tumorales en el TME o el reclutamiento masivo de linfocitos Treg, son también factores que pueden comprometer las respuestas de las células T-CAR (20,23). Además, se ha descrito que producen una fuerte activación de la respuesta inmunológica del paciente, que se relaciona con efectos adversos graves (como el síndrome de liberación de citoquinas o la presencia de neurotoxicidad) (16).

Con el fin de resolver los diferentes inconvenientes planteados, se investiga en la selección múltiple de antígenos, la sobreexpresión de receptores de citocinas y quimiocinas, la mejora de la señalización coestimuladora y la supresión de reguladores negativos de células T. De este modo, las células T-CAR de próxima generación, resultan ser prometedoras en modelos preclínicos para el tratamiento de tumores sólidos (20).

4.2. Mejora del reconocimiento de antígeno de células T-CAR

La respuesta ante la aparición de reacciones cruzadas se apoya en la mejora del reconocimiento de los antígenos asociados a tumores (TAA). Se necesita encontrar moléculas diana que se sobreexpresen en células tumorales para incrementar la potencia de las células T-CAR y evitar toxicidades (20,26).

En la actualidad se han desarrollado estrategias que implican la selección simultánea de dos o más TAA diferentes, como es el caso de las Uni-CAR y las Gate-CAR; o la conjunción de más de un scFv para un mismo receptor CAR como en las Tan-CAR (**Figura 7**) (20,23). Estos modelos permiten mantener su citotoxicidad (e incluso aumentarla), mejorar la expansión en el rango de TAA reconocidos y la moderación del escape de antígenos. En cambio, la combinación de múltiples dianas incrementa la probabilidad de efectos de las células T-CAR fuera del tumor, lo que sugiere evaluar su riesgo/beneficio antes de establecerlos como alternativas en la práctica clínica.

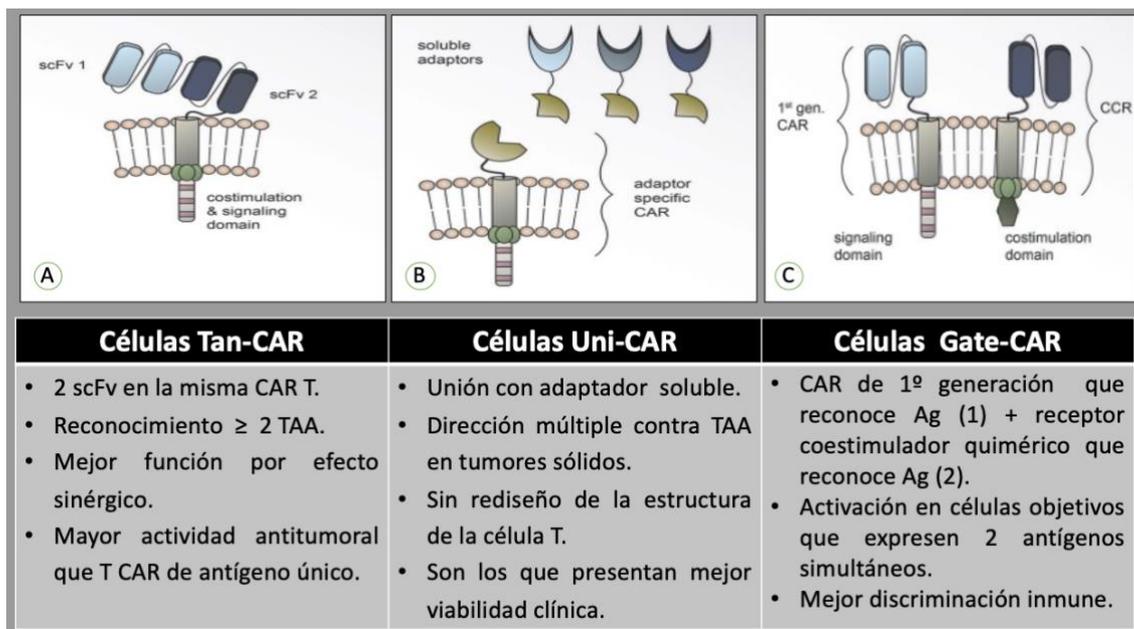


Figura 7. Modificaciones de un CAR de múltiples objetivos Se pueden observar las diferentes opciones combinatorias de células T-CAR que tienen por objetivo aumentar el reconocimiento tumoral. Cada una de las ediciones diferentes están explicadas en los cuadros de foto, así como sus principales ventajas. Tan-CAR = Célula T-CAR en tándem. Uni-CAR = Célula T-CAR universal. Gate-CAR = Célula T-CAR de puerta “Y”. Ag: antígeno Imagen adaptada de (23). Referencias: (8,20,23,26).

4.3. Optimización del dominio de señalización coestimulador

La elección de las moléculas coestimuladoras resulta crucial para modular la actividad de las células T-CAR. Estas moléculas también afectan a la cinética, perfil tumoricida y seguridad de células T-CAR. Por lo tanto, es de vital importancia conocer sus características con el fin de mejorar la eficacia de la terapia celular adoptiva. Los CSSD que han demostrado ser más efectivos para la eliminación de tumores corresponden a las proteínas CD28 y 4-1BB (20,22,26).

El receptor CD28 se expresa de forma constitutiva por las células T CD4+ y T CD8+. La unión con sus ligandos (CD80 y CD86) se relaciona con una disminución del tiempo de proliferación y una mejor eliminación tumoral por parte de las células T (20,22). Por otro lado, la proteína 4-1BB, dota a las células T de una mayor supervivencia en el organismo a través de funciones de protección y proliferación (10).

Otras moléculas coestimuladoras con efectos importantes en las células T-CAR corresponden a los ICOS (coestimulador inducible de células T), que a pesar de no conocerse con certeza sus funciones, se cree que tienen un papel importante en las funciones de las células T y en su diferenciación; OX40 promueve la expansión de las

células T efectoras y de memoria; aunque también destaca por regular la producción de citocinas y la diferenciación y actividad de las células T reguladoras. También, la agregación del receptor tipo toll 2 (TLR2) fortalece la función efectora y reduce el umbral de activación de la señalización coestimuladora de las células T CD8⁺ (10,20,22).

4.4. Expresión de citoquinas transgénicas

Para llevar a cabo una óptima activación de las células T, además de la participación del antígeno y las señales coestimuladoras, se necesita del aporte de citocinas. No obstante, en el TME esta última señal es deficiente, lo que dificulta la activación completa de las células T. Es por ello que la fabricación de células T-CAR que proporcionen buen soporte de citocinas, ayudará a promover su activación y proliferación (20).

La toxicidad sistémica producida por la administración exógena de citocinas en pacientes oncológico, dio lugar al desarrollo de células T *TRUCKS* (*del inglés, T cells redirected for universal cytokine killing*) (23). Constituyen la cuarta generación de CAR, que se basan en la segunda generación, pero incluyen una interleucina (como IL-12) expresada constitutivamente con la activación de CAR (**Figura 8**). A partir de la activación de estos CAR, se promueve la producción y secreción de citocinas que inducirán la muerte del tumor, mediante exocitosis (perforinas, granzimas) o por sistemas de muerte Fas-FasL o TRAIL (27).

Actualmente se está explorando una quinta generación de CAR; estos también se basan en la segunda generación de CAR, pero contienen un dominio de cadena β del receptor de IL-2 citoplasmático truncado con un sitio de unión para el factor de transcripción STAT3, que proporciona las tres señales sinérgicas requeridas fisiológicamente para impulsar la activación y proliferación de células T.

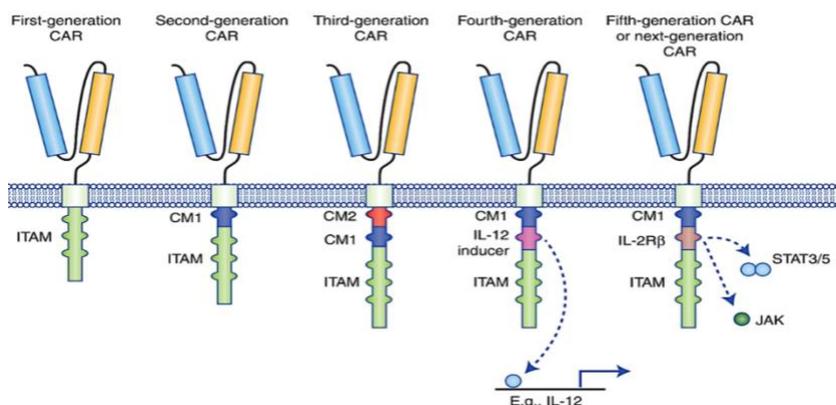


Figura 8. Estructura de nuevas generaciones de CAR. ITAM: motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina. CM: molécula coestimuladora; Adaptado de (27).

4.5. Atracción de células T-CAR al tumor

La insuficiente acumulación intratumoral de células T en tumores sólidos se debe fundamentalmente a las condiciones del TME, que una vez generada la angiogénesis, producen bajos niveles de oxígeno, pH, y nutrientes, entre otros (20). Además, los tumores sólidos son capaces de secretar inmunofactores, a fin de evitar que las células T efectoras puedan infiltrarse en el lecho tumoral (p.ej.: quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento); a diferencia de los tumores hematológicos que tienden a migrar a los mismos lugares donde residen las células T (como los ganglios linfáticos) (22). Por lo tanto, debe mejorarse su atracción hacia el TME, con una serie de procesos como: adhesión de células endoteliales, identificación de las quimiocinas secretadas por el tumor y la sobreexpresión de receptores de estas quimiocinas en las células T-CAR (**Figura 9**) (21).

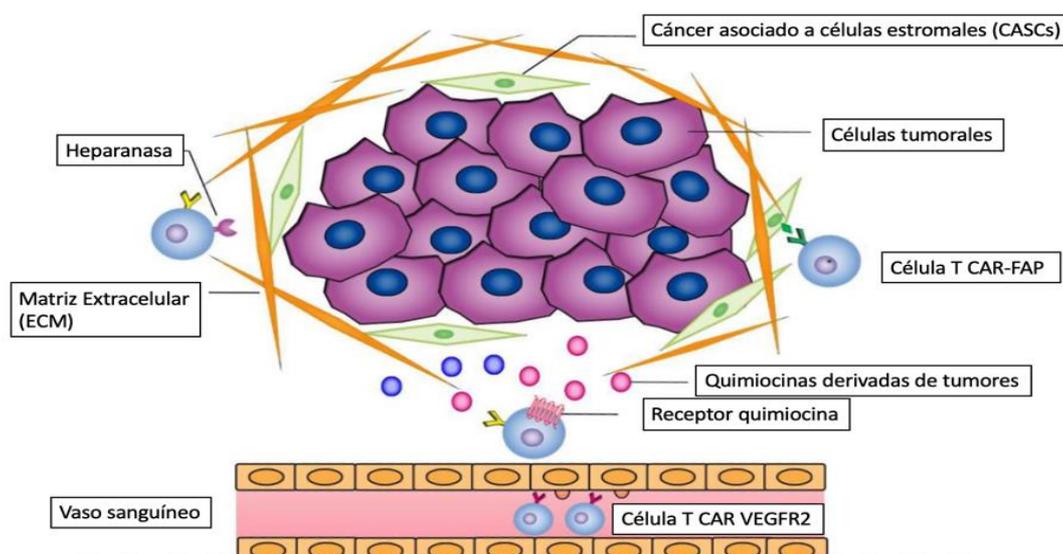


Figura 9. Estrategias de aumento del tráfico de células T-CAR hacia el sitio del tumor (20).

Las combinaciones de receptores de quimiocinas constituyen la principal estrategia actual para facilitar la migración hacia los tumores objetivos (20). Requiere encontrar el receptor ideal y que coincida específicamente con la quimiocina producida por la célula tumoral; entre otros factores relacionados con el ambiente tumoral que pueden afectar a su eficacia (22).

Los vasos sanguíneos tumorales y la matriz extracelular (MEC), también impiden la infiltración de las células T-CAR (26,28). Para ello, se han adoptado medidas mediante la expresión de receptores dirigidos contra el factor de crecimiento endotelial vascular

(VEGFR2), o incluso, frente a marcadores de superficie de las células estromales asociadas al cáncer (CASC) (**Tabla 4**) (20).

| CÉLULA T-CAR MODIFICADA | RECEPTOR EXPRESADA | DIANA | ENSAYO |
|-------------------------|--------------------|--|---|
| <i>T αvβ6 CAR</i> | - CXCR2 y CXCR1 | - IL-8 e integrina αvβ6 | Cáncer de páncreas, mama y ovario (29) |
| <i>T CXCR3 CAR</i> | -CXCR3 | - CXCL9 y CXCL10 | Melanoma y cáncer colorrectal (30) |
| <i>T CD30 CAR</i> | -CCR4 | -CCL17 y CCL22 | Linfoma Hodgkin (20) |
| <i>T DC101-CAR</i> | -DC101-CAR | - VEGFR2 | Adenocarcinoma de colon MC38, melanoma B16 y sarcoma MCA-105 (31) |
| <i>T FAP CAR</i> | - FAP | - CASC FAP | Cáncer de mama y próstata (20) |
| <i>T G2D CAR</i> | -Heparanasa | -Proteoglicano de heparán sulfato de ECM | Neuroblastoma (20) |

Tabla 4. Mejora de células T-CAR a partir de receptores de quimiocinas tumorales. En la siguiente tabla se pueden observar algunas de las estrategias de modificación con diferentes receptores de quimiocinas y proteínas asociados a tumores sólidos en fase clínica de investigación con animales. Ante los resultados de los diferentes ensayos, las modificaciones presentan resultados positivos con aumento de la infiltración y del efecto antitumoral. Se requiere mayor investigación en células T FAP-CAR por posible toxicidad ósea. CXCR1: receptor de IL-8α. CXCR2: receptor de IL-8β. CXCR3: receptor acoplado a proteína Gαi. FAP: proteína de activación de fibroblastos. ECM: matriz extracelular. (20,29,31).

La problemática de una atracción insuficiente de células T, representa un desafío funcional en la inmunoterapia contra el cáncer. Pese a la evidencia existente que sugiere que los circuitos de quimiocinas son claves para la localización de las células T en tumores, aún existe poco conocimiento de los comportamientos que envuelven al tumor y sus principales efectos sobre las T-CAR (21,26).

4.6. Remodelación del microambiente tumoral

El microambiente inmunosupresor localizado en muchos tumores sólidos supone la mayor necesidad insatisfecha del diseño de las células T anticancerígenas. Aunque las células T puedan reconocer y transitar con precisión hacia las células tumorales, la regulación negativa del TME no permite que puedan ejercer su acción y eliminarlas (**Figura 2**). Por tanto, regular los factores que alteran la función de las células T, mejorará la eficacia de las futuras T-CAR.

4.6.1. Acción contra receptores inhibidores

La activación de los receptores como PD-1, CTLA-4, LAG3, entre otros; mediante sus ligandos correspondientes, conducen a un estado de bloqueo de las células T y las hacen incapaces de producir un efecto citolítico contra las células tumorales (20, 26). Revertir esta debilidad, bloqueando las señales inmunosupresoras, puede permitir el desarrollo la función de estas células contra el tumor.

Se han propuesto diferentes estrategias basadas en la tecnología de edición genética como *CRISPR/Cas 9* o *AVV-cpf1*. Los genes que expresan los receptores o ligandos de inhibición o apoptosis, pueden ser eliminados de forma simultánea a través del uso de un sistema CRISPR, de esta forma es posible obtener células T-CAR más resistentes a la inmunomodulación (20,26) (**Tabla 5**). Se ha realizado un ensayo clínico de fase 1 con diversos tumores sólidos que expresan mesotelina (NCT0354815) con esta estrategia, del que todavía no existen resultados publicados debido al reciente cierre de la fase de estudio (32).

| REGULADOR DE CONTROL INMUNE | TÉCNICA DE EDICIÓN GENÉTICA | ENFERMEDAD | ENSAYOS CLÍNICOS | FASE | PATROCINADOR | REFERENCIA |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|--|------|------------------------------|------------|
| PD-1 | CRISPR-Cas9, AAV-Cpf1 | CML, TNBC, HCC, Glioma | NCT0354815 | I | Chinese PLA General Hospital | (33) |
| CTLA-4 | CRISPR-Cas9 | NMIBC, CML | Solo se encuentran en estados pre-clínicos | | | |
| LAG-3 | CRISPR-Cas9 | Linfoma de Burkitt, CLM | Solo se encuentran en estados pre-clínicos | | | |

Tabla 5. Aplicaciones de la combinación de tecnología de edición genética y CAR frente a reguladores de punto de control inmune.. AVV: virus adeno-asociativo. CML: leucemia mieloide crónica. TNBC: cáncer de mama triple negativo. HCC: carcinoma hepatocelular. NMIBC: cáncer de vejiga no músculo invasivo. Adaptado de (20).

La alternativa propuesta por un grupo de investigadores se basa en la edición mediante virus adenoasociativos (AVV-cpf1), que realiza la inserción de dos CAR distintos en la misma célula T. De modo que se potencia la acción de las células generadas, y se expresan niveles más bajos de receptores de inhibición (32). Actualmente, no se han iniciado estudios clínicos con esta herramienta de edición.

Es posible que se encuentren toxicidades inesperadas como consecuencia de una diferenciación terminal de las células T (34). Además del riesgo que supone la modificación del genoma de una célula tan compleja como es la humana.

Otra importante línea de investigación diseña un control de retroalimentación para T-CAR, que represente una solución ante la aparición de efectos indeseados. Se buscan marcadores que indiquen toxicidad; como IL-6 para el síndrome de liberación de citoquinas o tormentas de citocinas y aparición de neurotoxicidad. Este apartado supone un importante reto no solo para las T-CAR, sino para entender mejor la respuesta inmunológica, como se ha puesto de manifiesto con el COVID-19 (21).

5. Conclusión

1. El uso de células T-CAR para la leucemia linfoblástica aguda recurrente y para el linfoma de células B grandes, es en la actualidad un tratamiento de uso habitual en algunos hospitales.
2. Las células T-CAR presentan una serie de efectos secundarios derivados de la potente respuesta inmune que generan, en algunos casos, al interactuar con las células diana provocando la denominadas “tormentas de citocinas”, por ello se debe seguir investigando para modular esta respuesta.
3. Se necesita encontrar buenos biomarcadores asociados a tumores relacionados con la infiltración de células T para facilitar su penetrabilidad en tumores sólidos.
4. Se requiere conocer mejor los mecanismos por los cuales los receptores de acción inhibitoria regulan negativamente la función de las células T, así como el microambiente tumoral, para permitir una acción más eficaz de las células T.
5. La incorporación de dominios de expresión de interleuquinas en el CAR, puede ayudar a mejorar la activación y supervivencia de las T-CAR, y evitar el uso de tratamiento combinados con interleuquina.
6. Para mejorar la transferencia de células T-CAR a la zona tumoral, es necesario conocer mejor las quimiocinas generadas en los microambientes tumorales y expresar o sobreexpresar sus receptores en las células T-CAR.
7. La incorporación de herramientas de edición genética tipo CRISPR-cas9, están permitiendo modificar y resolver algunos de los problemas relacionados con receptores de inhibición. Pueden ser una buena solución para eliminar algunos de los inconvenientes antes citados.

6. Referencias

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 9. ed. Barcelona: Elsevier; 2018.
2. Inmunidad innata y adaptativa - EMEI [Internet]. [cited 2020 Jul 4]. Available from: https://epidemiologiamolecular.com/inmunidad-innata-adaptativa/#_Toc222394988
3. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular Helper T Cells: Lineage and Location. Immunity [Internet]. 2009 Mar 20 [cited 2020 Jul 4];30(3):324–35. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761309001149/fulltext>
4. Zaru R. Receptores que reconocen patrones | Inmunología [Internet]. [cited 2020 Jul 4]. Available from: <http://inmunologia.eu/receptores-y-moleculas/receptores-que-reconocen-patrones-prrs>
5. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. INMUNOLOGÍA de Kuby. 6.ed. México, D. F.; 2007.
6. X. Filella, R. Molina, AM. Ballesta. Estructura y función de las citocinas | Medicina Integral. Medicina integral [Internet]. 2002 Jan [cited 2020 Jul 4];39(Núm.2):63–71. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
7. Murphy K, Travers P, Walport M. INMUNOLOGÍA DE JANEWAY. 7.ed. México, D.F.; 2009.
8. Zabel M, Tauber PA, Pickl WF. The making and function of CAR cells. Immunology letters [Internet]. 2019/06/07. 2019 Aug;212:53–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31181279>
9. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Current opinion in immunology [Internet]. 2010/04/02. 2010 Jun;22(3):333–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363604>
10. Immune Checkpoint Signaling Pathway - Creative Diagnostics [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from: <https://www.creative-diagnostics.com/immune-checkpoint-signaling-pathway.htm>

11. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. Vol. 35, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2015. p. S185–98.
12. de León J, Pareja A. Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horizonte Médico (Lima)* [Internet]. 2018 Dec 31 [cited 2020 Jul 4];18(3):80–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11>
13. Zhang J, Shi Z, Xu X, Yu Z, Mi J. The influence of microenvironment on tumor immunotherapy. *The FEBS journal* [Internet]. 2019/08/22. 2019 Nov;286(21):4160–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31365790>
14. Chen N, Morello A, Tano Z, Adusumilli PS. CAR T-cell intrinsic PD-1 checkpoint blockade: A two-in-one approach for solid tumor immunotherapy. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 Dec 23;6(2):e1273302–e1273302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344886>
15. Xie F, Xu M, Lu J, Mao L, Wang S. The role of exosomal PD-L1 in tumor progression and immunotherapy. *Molecular cancer* [Internet]. 2019 Oct 23;18(1):146. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31647023>
16. Tipos de tratamiento - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [cited 2020 Jul 4]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
17. Inogés S, Rodríguez Calvillo M, López Díaz de Cerio A, Zabalegui N, Melero I, Sánchez Ibarrola A, et al. Inmunoterapia activa en el tratamiento de neoplasias hematológicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* [Internet]. 2004 [cited 2020 Jul 4];27(1):45–62. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272004000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
18. Aplicaciones de la Inmunoterapia - Top Doctors Blog [Internet]. [cited 2020 Jul 4]. Available from: <https://www.topdoctors.es/blog/aplicaciones-de-la-inmunoterapia/>
19. Montilla Morales C, Gómez-Castro S, Sánchez M, López R, Hidalgo C, del Pino-Montes J. Nuevas dianas terapéuticas en artritis psoriásica. *Reumatología Clínica*

- [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2020 Jul 4];8(SUPPL.1):15–9. Available from: <http://www.reumatologiaclinica.org/es-nuevas-dianas-terapeuticas-artritis-psoriasica-articulo-S1699258X12000319>
20. Tian Y, Li Y, Shao Y, Zhang Y. Gene modification strategies for next-generation CAR T cells against solid cancers. *Journal of hematology & oncology* [Internet]. 2020 May 18;13(1):54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32423475>
 21. Li J, Li W, Huang K, Zhang Y, Kupfer G, Zhao Q. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *Journal of hematology & oncology* [Internet]. 2018 Feb 13;11(1):22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29433552>
 22. Hay KA, Turtle CJ. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells: Lessons Learned from Targeting of CD19 in B-Cell Malignancies. *Drugs* [Internet]. 2017 Mar;77(3):237–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110394>
 23. Schmidts A, Maus M v. Making CAR T Cells a Solid Option for Solid Tumors. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2018 Nov 8;9:2593. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30467505>
 24. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature* [Internet]. 2017 May 24;545(7655):423–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28541315>
 25. Xu Y, Yang Z, Horan LH, Zhang P, Liu L, Zimdahl B, et al. A novel antibody-TCR (AbTCR) platform combines Fab-based antigen recognition with gamma/delta-TCR signaling to facilitate T-cell cytotoxicity with low cytokine release. *Cell discovery* [Internet]. 2018 Nov 20;4:62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30479831>
 26. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* [Internet]. 2017 Feb 9;168(4):724–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187291>
 27. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells [Internet]. Vol. 120, *British*

- Journal of Cancer. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Jun 27]. p. 26–37. Available from: [/pmc/articles/PMC6325111/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31185212/)
28. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, Ronet C, Barras D, Duttagupta PA, et al. Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer cell* [Internet]. 2019 Jun 10;35(6):885-900.e10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31185212>
 29. Whilding LM, Halim L, Draper B, Parente-Pereira AC, Zabinski T, Davies DM, et al. CAR T-Cells Targeting the Integrin $\alpha\beta 6$ and Co-Expressing the Chemokine Receptor CXCR2 Demonstrate Enhanced Homing and Efficacy against Several Solid Malignancies. *Cancers* [Internet]. 2019 May 14;11(5):674. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31091832>
 30. Mikucki ME, Fisher DT, Matsuzaki J, Skitzki JJ, Gaulin NB, Muhitch JB, et al. Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nature communications* [Internet]. 2015 Jun 25;6:7458. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26109379>
 31. Chinnasamy D, Yu Z, Theoret MR, Zhao Y, Shrimali RK, Morgan RA, et al. Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. *The Journal of clinical investigation* [Internet]. 2010/10/11. 2010 Nov;120(11):3953–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20978347>
 32. Dai X, Park JJ, Du Y, Kim HR, Wang G, Errami Y, et al. One-step generation of modular CAR-T cells with AAV-Cpf1. *Nature methods* [Internet]. 2019/02/25. 2019 Mar;16(3):247–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30804551>
 33. Study of CRISPR-Cas9 Mediated PD-1 and TCR Gene-knocked Out Mesothelin-directed CAR-T Cells in Patients With Mesothelin Positive Multiple Solid Tumors. - Full Text View - *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [cited 2020 Jun 18]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03545815?cond=NCT03545815&draw=2&rank=1>

34. Rodríguez-García A, Palazon A, Noguera-Ortega E, Powell Jr DJ, Guedan S. CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 Jun 17;11:1109. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7311654/>