

Inmunopotenciación en el contexto del microambiente tumoral y las estrategias de inmunoterapia celular adoptiva

Teresa Lozano, Celia Martín-Otal, Flor Navarro, Inés Sánchez-Moreno, Noelia Casares y Juan José Lasarte

Programa de Inmunología e Inmunoterapia, Centro de Investigación Médica Aplicada, CIMA, CCUN, Universidad de Navarra, IdiSNA, Pamplona

Resumen

Los recientes avances en inmunoterapia han revolucionado el tratamiento del cáncer. Además de los resultados que están consiguiendo las terapias basadas en el uso de anticuerpos que bloquean los puntos de control en la activación del sistema inmunitario (anticuerpos anti-*checkpoint*), las terapias de transferencia celular adoptiva, como las basadas en linfocitos infiltrantes de tumores o células modificadas genéticamente (linfocitos TCR transgénicos o células CAR-T), están mostrando resultados ilusionantes en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Sin embargo, las células cancerosas desarrollan mecanismos para escapar al control del sistema inmunitario, con el resultado de que muchos pacientes no responden a estas terapias o lo hacen solo de forma transitoria. Esta pobre eficacia es más evidente en el caso de los tumores sólidos. El fracaso de las terapias celulares para lograr el control del tumor a largo plazo es multifactorial. Por un lado, solo un porcentaje limitado de los linfocitos transferidos es capaz de circular por el torrente sanguíneo, interactuando y atravesando el endotelio tumoral para infiltrarse en el tumor. La competencia metabólica, el consumo excesivo de glucosa, la elevada secreción de ácido láctico y la acidificación del pH extracelular, la escasez de aminoácidos esenciales, las condiciones hipóxicas o la acumulación de

ácidos grasos en el microambiente tumoral dificultan en gran medida la acción antitumoral de las células inmunitarias en las estrategias de terapia de transferencia celular adoptiva. Por ello, existe una nueva tendencia en la investigación de la inmunoterapia que busca desentrañar la biología fundamental que sustenta la respuesta a la terapia e identifica nuevos enfoques para amplificar mejor la eficacia de las inmunoterapias. En esta revisión abordamos aspectos importantes que pueden afectar significativamente la eficacia de las terapias de transferencia celular adoptiva, indicando también las alternativas terapéuticas que estamos implementando en nuestro grupo para superar estos inconvenientes.

Palabras clave: microambiente tumoral, matriz extracelular, terapia CART, pH intratumoral, EGFR, células T reguladoras, Foxp3.

Introducción

Los avances en el conocimiento del sistema inmunitario y su aplicación al desarrollo de estrategias de inmunoterapia han revolucionado el tratamiento del cáncer.

El descubrimiento de los múltiples niveles de frenos, conocidos como puntos de control inmunitarios del sistema inmunitario para regular negativamente la activación y la función de las células T y de otras células inmunitarias, ha abierto la puerta al desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. El uso de terapias celulares adoptivas, como las basadas en linfocitos infiltrantes de tumores o células modificadas genéticamente

(linfocitos TCR [*T cell receptor*] transgénicos o células CAR-T [*chimeric antigen receptor T-cell*]), ha mostrado resultados impresionantes en el tratamiento de diversos cánceres. Sin embargo, las células cancerosas pueden explotar mecanismos para escapar de la inmunovigilancia, y muchos pacientes no responden a estas terapias o lo hacen solo de forma transitoria.

El fracaso de la inmunoterapia para lograr un control tumoral a largo plazo es multifactorial¹. Por un lado, solo un porcentaje limitado de los linfocitos transferidos es capaz de pasar por el torrente sanguíneo, interactuando y atravesando el endotelio tumoral para

infiltrarse en el tumor. Aunque la inflamación y sus mediadores son los principales directores de este proceso de reclutamiento, sus efectos protumorales sobre las células y sus efectos sobre numerosas células del sistema inmunitario o sobre el endotelio tumoral y su estroma, dificultan mucho el tránsito de los linfocitos hacia el interior del tumor para interactuar con las células cancerosas.

La formación aberrante de matriz extracelular y de vascularización, junto con la alteración de la inflamación y la producción de una serie de factores quimiotácticos, promueven una amplia heterogeneidad en los tipos celulares que infiltran el tumor para ejercer sus funciones, que en muchos casos antagonizan la acción antitumoral del sistema inmunitario. La competencia metabólica, el consumo excesivo de glucosa, la elevada secreción de ácido láctico y la acidificación del pH extracelular, la escasez de aminoácidos esenciales, las condiciones hipóxicas o la acumulación de ácidos grasos en el microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*), dificultan en gran

medida la actividad antitumoral de las estrategias de terapia celular adoptiva.

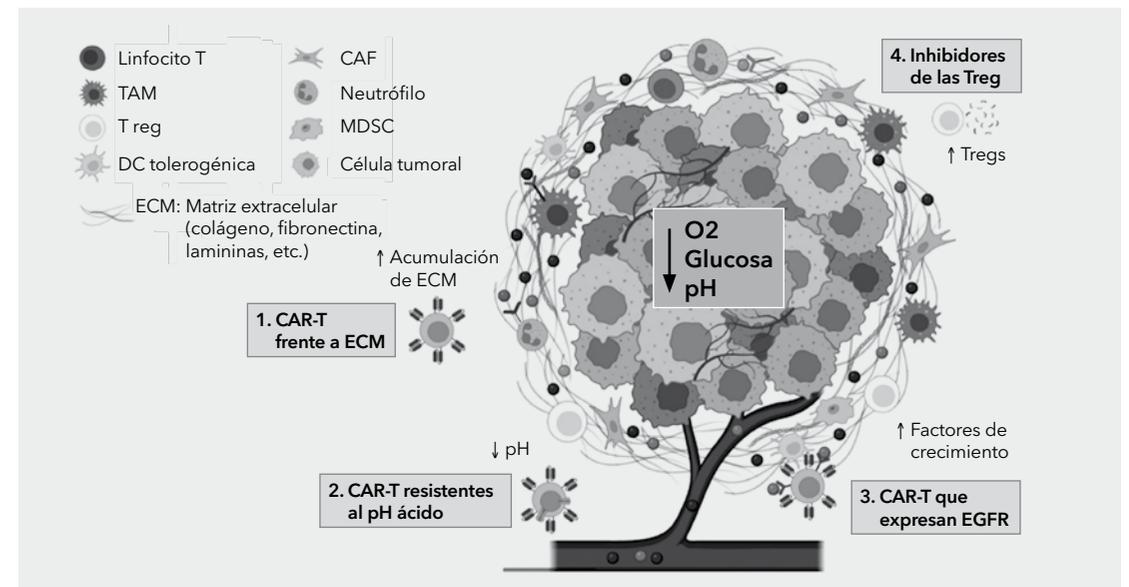
Esta realidad ha resaltado la importancia de una comprensión más profunda del mecanismo que rige el tráfico, la activación, el agotamiento o la falta de respuesta de las células T, así como las estrategias de evasión inmunitaria del tumor. Existe un gran interés en delinear la biología fundamental que sustenta la respuesta a la terapia y en identificar nuevos enfoques para amplificar la eficacia de las inmunoterapias.

A continuación, exponemos aspectos importantes que pueden afectar significativamente a la eficacia de las terapias celulares adoptivas, indicando también algunas alternativas terapéuticas que estamos implementando para superar estos inconvenientes (figura 1).

Barreras físicas y matriz extracelular

Existen varios factores que pueden alterar la migración transendotelial y la entrada de linfocitos al lecho tumoral². Entre ellos, la expansión tumoral acelerada da como resultado

Figura 1. Algunas estrategias para mejorar la actividad antitumoral de la terapia celular adoptiva. **1)** La aberrante matriz extracelular tumoral ofrece antígenos con la proteína EDA de la fibronectina que pueden ser dianas en el desarrollo de células CAR-T. **2)** La modificación génica de las CAR-T para que expresen transportadores reguladores del pH intracelular puede facilitar la funcionalidad de las CAR-T en el pH ácido que existe en los tumores. **3)** La sobreexpresión de receptores de EGFR puede permitir a las CAR-T beneficiarse de las propiedades proliferativas de los ligandos de EGFR presentes en muchos tumores. **4)** El uso de inhibidores de las células Treg puede facilitar la acción de las células CAR-T en el tumor. CAF: cancer associated fibroblasts; DC: dendritic cell; EGFR: epidermal growth factor receptor; MDSC: myeloid derived suppressor cells; TAM: Mymot associated macrophages; Treg: T regulatory lymphocyte.



condiciones hipóxicas, lo que conduce a la activación del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), que a su vez induce la regulación al alza de factores angiogénicos como el factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF,

fibroblast growth factor) que favorecen la hipervascularización aberrante³. El uso de inhibidores de la angiogénesis para normalizar la vasculatura tumoral ha llamado mucho la atención. Sin embargo, la activación de vías angiogénicas alternativas por parte del tumor a menudo genera resistencia⁴. Los enfoques inmunológicos para interrumpir la vasculatura tumoral se han probado con éxito en estudios preclínicos^{4,5}. En particular, las células T que expresan CAR dirigidas a antígenos de la vasculatura tumoral, como VEGF-1 o VEGF-2, integrina $\alpha\beta 3$, TEM8, empalme alternativo EDB de fibronectina o CLEC14A¹, han mostrado cierta eficacia, aunque en algunos casos aparece el temido efecto de toxicidad denominado *on target-off tumor* asociado a la expresión de estos antígenos en tejidos sanos no tumorales^{6,7}.

Además de la vasculatura aberrante, el estado fibrótico de los tumores desmoplásicos puede afectar la infiltración tumoral de linfocitos. Ahora es bien aceptado que los carcinomas se comportan como heridas, lo que obliga

al TME del huésped a un estado constante de reparación fibrótica⁸ con una remodelación continua y extensa de la matriz extracelular promovida por la inflamación crónica presente en el tumor.

Las células tumorales secretan factores de crecimiento para atraer fibroblastos al TME, donde se transforman en fibroblastos asociados al cáncer, los principales actores de la acumulación de matriz extracelular. Una característica particular de la matriz extracelular estromal en muchos cánceres es su estructura altamente fibrótica, con acumulación de fibrillas de colágeno tipo I extensamente entrecruzadas⁹, que afecta de manera significativa a la progresión tumoral, la metástasis y la respuesta a la terapia¹⁰. Esta fibrillogénesis de colágeno está respaldada por redes de fibronectina que pueden proporcionar una plantilla para el depósito de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, incluyendo LTBP1, fibulina, tenascina, laminina, hialuronano y trombospondina, entre otras moléculas. En los tumores inmunoexcluidos existe un abundante infiltrado de células inmunitarias que no

logran penetrar de forma efectiva en el parénquima tumoral y quedan en el estroma que rodea los nidos de células tumorales. Este fenotipo inmunitario se caracteriza por un depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular, incluidos haces alineados densos de colágeno y fibronectina alrededor de los islotes tumorales. Curiosamente, se ha observado en estudios de imágenes de células vivas en secciones de tejido tumoral que la motilidad activa de las células T aumenta en regiones con menos fibronectina y colágeno I, mientras que las células T migran mal en áreas de matriz densa^{11,12}. Este hallazgo respalda la idea de que una matriz extracelular rica en fibra puede actuar como un escudo entre las células T y las células tumorales que previene la infiltración de células T en el TME.

El hecho de que la matriz extracelular presente en los tejidos tumorales sea muy diferente de la que se encuentra en los tejidos sanos ofrece la posibilidad de encontrar dianas terapéuticas nuevas para el desarrollo de terapias CAR-T. En efecto, uno de los principales desafíos para la traducción de terapias basadas en células CAR-T

para tumores sólidos es la identificación de antígenos específicos expresados en la membrana de la célula tumoral. En este esfuerzo, es necesario explorar otros antígenos alternativos presentes en el TME, aunque no sean expresados por la propia célula tumoral. Una diana prometedora es la fibronectina y sus versiones de *splicing*, que son clave en la reorganización de la matriz extracelular tumoral para promover el crecimiento, la migración y la invasión tumorales, y para alterar la capacidad de respuesta de las células tumorales a la terapia¹³. En este escenario, nuestro grupo se planteó la utilización de la proteína EDA, un *splicing* alternativo de la fibronectina que incluye el dominio extra A, como antígeno diana para el desarrollo de terapias CAR-T. Demostramos que EDA se expresa en muchos tipos de tumores, mientras que es indetectable en tejidos normales. Generamos células CAR-T específicas de EDA que se probaron *in vitro* e *in vivo* en cuanto a su capacidad para rechazar tumores. Demostramos que las células EDA CAR-T reconocen EDA y muestran actividad antitumoral *in vivo* en varios modelos murinos de tumores, como ratones inmunocompetentes

portadores de teratocarcinoma F9 o ratones NSG portadores de hepatocarcinoma humano derivado de la línea celular PLC.

La actividad antitumoral de EDA CAR-T parece estar mediada, al menos en parte, por el interferón gamma (IFN- γ). Esta citocina podría tener un efecto directo sobre las células tumorales al inhibir la proliferación celular o sensibilizar las células a la apoptosis¹⁴, regular al alza la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y con ello aumentar la lisis de las células tumorales por parte de las células T antitumorales endógenas¹⁵, estimular la actividad de las células NK¹⁶ o inhibir la angiogénesis¹⁷. En nuestro caso, demostramos que la actividad antitumoral se debía en parte a su efecto antiangiogénico. Por lo tanto, se puede especular que la actividad antiangiogénica dependiente del IFN- γ puede constituir un importante mecanismo de acción de las células EDA CAR-T. El análisis RNAseq de los tejidos tumorales tras el tratamiento reveló un efecto importante de la terapia EDA CAR-T en el TME, con una

reducción significativa en las firmas genéticas asociadas con la transición epitelio-mesénquima, genes que codifican proteínas de colágeno o genes regulados al alza durante la formación de vasos sanguíneos, así como en conjuntos de genes que definen la inflamación, indicando que la estrategia de atacar una proteína presente en la matriz extracelular de los tumores puede reprogramar el TME y favorecer la respuesta antitumoral¹⁸.

Actividad metabólica y pH intratumoral

Las células cancerosas con metabolismo anómalo y captación excesiva de glucosa para la glucólisis aeróbica consumen grandes cantidades de oxígeno y nutrientes, lo que provoca hipoxia, deficiencia nutricional y niveles elevados de subproductos metabólicos en el TME¹⁹. Este TME altamente inmunosupresor inhibe la función de las células T e induce el escape inmunitario. Varios estudios han demostrado que las células T que se infiltran en el tumor se vuelven anérgicas y se agotan, y presentan firmas metabólicas distintas²⁰.

Por un lado, las altas tasas metabólicas de las células cancerosas en combinación con una vasculatura deficiente hacen que el TME sea altamente hipóxico. Por otro lado, la alta demanda energética que presenta el tumor provoca una deficiencia de glucosa en el TME, que afecta de manera negativa a la activación de los linfocitos T antitumorales. Debido a que tanto las células cancerosas como las células T efectoras experimentan glucólisis aeróbica en el TME, existe una fuerte competencia por la glucosa, lo que deteriora la función de las células T infiltrantes y la inmunidad antitumoral. La modulación del metabolismo de las células T se está convirtiendo en una vía emocionante para mejorar las inmunoterapias actuales y aumentar la inmunidad antitumoral de las células T en el TME adverso²¹. La preparación del metabolismo de las células T *in vitro* antes de la transferencia adoptiva al paciente es una forma de ampliar su actividad antitumoral *in vivo*.

Los productos finales de la glucólisis son el lactato y los protones (H⁺), que son secretados masivamente por las células cancerosas y se acumulan en el

TME. Este exceso de lactato afecta la función y la proliferación de las células T efectoras y la inmunidad antitumoral²². La acumulación de lactato y protones (H⁺) en el TME provoca la acidificación del tumor. Un pH ácido intratumoral de 6-6,5 se asocia con metástasis, angiogénesis y resistencia a la terapia, fenotipo característico de tumores más agresivos²³. Además, el pH ácido tiene efectos perjudiciales sobre la función de las células T infiltrantes. El pH ácido inhibe directamente la función de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, y la inmunidad antitumoral mediada por los linfocitos T, lo que da como resultado tolerancia y escape inmunitario²⁴. Algunos trabajos han demostrado que elevar el pH del TME mediante la administración de bicarbonato de sodio mejora las respuestas inmunitarias antitumorales en modelos de ratón²⁵ y en pacientes con leucemia mieloide aguda²⁶. Estos datos indican que el efecto negativo que tiene el TME ácido sobre los linfocitos infiltrantes puede controlarse e incluso revertirse alcalinizando el TME.

Aunque las células T son muy sensibles al pH ácido, tienen mecanismos para

resistir la acidificación intracelular del pH (pHi) y lograr la homeostasis ácido-base. Para recuperarse de la acidificación o alcalinización intracelular, las células cuentan con transportadores extrusores y cargadores de iones para mantener el pHi dentro de un rango fisiológico estrecho, que en general es en torno a 7,2. En particular, las células cancerosas aprovechan varias bombas de protones y transportadores para neutralizar la carga de ácido metabólico y lograr valores de pH más altos que las células normales, lo que promueve la proliferación celular y la evasión de la apoptosis, y favorece la progresión del tumor^{27,28}. En consecuencia, los sensores de pH fisiológicos son dianas muy prometedoras para el diseño de terapias frente al cáncer.

Las terapias celulares adoptivas basadas en CAR-T pueden verse afectadas por este microambiente ácido hostil. Como otros grupos han descrito previamente^{29,30}, nosotros encontramos que un pH tan bajo como 6,5 provoca una proliferación y una producción deficientes de IFN- γ y de interleucina (IL) 2 en respuesta a la

estimulación de TCR en células T CD4+ y CD8+ murinas y humanas. En este escenario probamos la posibilidad de mantener un pH más básico mediante la sobreexpresión de canales de extrusión de protones. Por esta razón, modificamos genéticamente las células T para sobreexpresar el extrusor de protones Hvcn1. Descubrimos que la sobreexpresión de Hvcn1 en linfocitos aumenta sus capacidades proliferativas y productoras de citocinas incluso en condiciones de cultivo de pH ácido. En particular, observamos que a pH tan bajo como 6,5, que impide la correcta actividad de los linfocitos T, la modificación génica para la sobreexpresión de Hvcn1 permitía al linfocito mantener una alta actividad funcional, similar a la observada en condiciones fisiológicas. Estos resultados sugieren que Hvcn1 protege a las células de la acidificación excesiva, facilitando la señalización de TCR que, como ya se ha descrito, se ve afectada por el pH ácido que conduce a un estado anérgico. Observamos además que la sobreexpresión de Hvcn1 mejoró la eficacia antitumoral de las células CAR-T específicas para el antígeno glipican-3 expresado en células de

hepatocarcinoma en un modelo murino, lo que sugiere que el control de la acidificación del pHi excesivo también puede tener un efecto positivo en las terapias basadas en células CAR-T para tumores sólidos³¹. En paralelo observamos que el silenciamiento del intercambiador de aniones AE2 (un potente acidificador celular) también conseguía mejorar la actividad antitumoral de los linfocitos en condiciones de pH ácido³¹.

En conclusión, hemos hallado que el silenciamiento del acidificante AE2 y la sobreexpresión del canal de protones Hvcn1 pueden ofrecer una ventaja para los linfocitos, mejorando así su funcionalidad en condiciones de pH ácido desfavorables presentes en el TME, y podría constituir una alternativa para la mejora de las terapias contra el cáncer basadas en la transferencia celular adoptiva de linfocitos T.

Factores de crecimiento presentes en el microambiente tumoral

En varios tipos de tumores, el crecimiento y la supervivencia de las células de carcinoma parecen estar mantenidos por una red de receptores/

ligandos de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Está bien establecido que el EGFR se expresa de manera ubicua, pero en general se cree que está ausente en el linaje de células hematopoyéticas, con la excepción de la expresión esporádica descrita en monocitos o células plasmáticas. Los estudios también han demostrado que las células T reguladoras (Treg) Foxp3+ expresan EGFR en condiciones inflamatorias. El ligando de EGFR anfirregulina mejora notablemente la función de las células Treg *in vitro* e *in vivo*³²⁻³⁴. Curiosamente, las células T efectoras convencionales no expresan EGFR³⁴ y, por lo tanto, no se benefician de la presencia de ligandos de EGFR en el TME. Especulamos que si las células T transferidas adoptivamente pudieran responder a estos ligandos, podrían persistir y proliferar mejor dentro del TME. Modificamos genéticamente células T CD8+ antitumorales para expresar EGFR y estudiamos el efecto de los ligandos de EGFR en su función *in vitro* e *in vivo*. Descubrimos que las células T CD8+ transducidas con un retrovirus para expresar EGFR

respondieron a los ligandos de EGFR activando la vía de señalización de EGFR. Estas células T efectoras que expresan EGFR proliferaron mejor y produjeron más IFN- γ y factor de necrosis tumoral alfa en presencia de ligandos de EGFR producidos por células tumorales *in vitro*. Las células T CD8 que expresan EGFR fueron más eficientes en la eliminación de células tumorales que las células T CD8 control, y también fueron más eficientes para retrasar el crecimiento tumoral en un modelo tumoral murino *in vivo*³⁵. Nuestros resultados sugieren que la modificación genética de las células T CD8+ para expresar EGFR podría considerarse en estrategias inmunoterapéuticas basadas en la transferencia adoptiva de células T antitumorales contra cánceres que expresan ligandos de EGFR.

Células inmunosupresoras infiltrantes del tumor

La complejidad de la matriz extracelular y el desequilibrio de las quimiocinas en el TME promueven en gran medida la presencia de células Treg, macrófagos asociados a tumores, células supresoras

mieloides y otras poblaciones inmunosupresoras que dificultan en gran medida la capacidad de las células T para reconocer y eliminar las células tumorales³⁶. Entre ellas, las células Treg representan un componente crucial del sistema inmunitario y son esenciales para controlar la autotolerancia. Sin embargo, son capaces de suprimir la función de las células T reactivas a tumores. De hecho, las Treg se encuentran infiltrando muchos tipos de tumores humanos y se asocian con un alto riesgo de muerte y una supervivencia reducida³⁷. El diseño de estrategias para inhibir la acción inmunosupresora de las células Treg es un enfoque interesante para mejorar las respuestas de células T antitumorales. Las Treg que infiltran los tumores se caracterizan por una alta expresión de marcadores como CTLA4, PD-1, LAG3, CD25, GITR, 41BB, ICOS, TIGIT, TIM3 y OX40 en comparación con las Treg periféricas³⁸. Estos marcadores son dianas potenciales para inhibir las Treg y trabajar en sinergia con las estrategias de terapia celular adoptiva^{38,39}. Las Treg se caracterizan por la expresión de CD25 y del factor de

transcripción FOXP3 específico de Treg, que es necesario para su desarrollo y función⁴⁰. Nuestro grupo ha desarrollado varios inhibidores peptídicos de FOXP3 que han demostrado su capacidad de inhibir las células Treg *in vivo*, mejorando su actividad antitumoral en modelos animales⁴¹⁻⁴⁴. Queda por dilucidar su posible sinergia con las terapias de transferencia celular adoptiva (ACT, *adoptive cell therapy*).

Razonablemente, la combinación de ACT con estrategias de inhibición de Treg podría mejorar la respuesta antitumoral. Sin embargo, el precondicionamiento tumoral con linfodepleción, mediante irradiación o ciclofosfamida, previo a la ACT, es la recomendación más establecida. No obstante, las terapias con células CAR-T siguen siendo vulnerables a múltiples factores de inmunosupresión extrínsecos, incluidas las Treg. Se ha demostrado que las células CAR-T potencian inadvertidamente las Treg al proporcionar una fuente de IL-2 para el consumo de Treg. Algunas estrategias, como las CAR de tercera generación, que son deficientes en la señalización

de Lck, pueden eludir la supresión de Treg⁴⁵. Otros enfoques se han centrado en la mejora de la resistencia de las células CAR-T a la supresión, en lugar de dirigirse directamente a las células supresoras. Por ejemplo, en un estudio, al utilizar células CAR-T con expresión constitutiva o inducida de IL-12, las células CAR-T transferidas fueron menos susceptibles a las Treg⁴⁶.

En la actualidad, numerosas compañías farmacéuticas y biotecnológicas están desarrollando modernas terapias para inhibir las Treg, como anticuerpos biespecíficos, inhibidores oligonucleotídicos antisentido de FOXP3, combinaciones de anticuerpos y nuevos fármacos conjugados⁴⁷. Sin embargo, solo unos pocos han sido probados en modelos de inmunoterapia ACT. Además, la homeostasis inmunitaria requiere un equilibrio entre los mecanismos efectores y supresores inmunitarios, y el agotamiento sistémico de Treg puede provocar el desarrollo de efectos adversos autoinmunitarios. Por lo tanto, la eliminación selectiva de las Treg que infiltran el tumor en el TME, mientras se preservan las poblaciones de Treg

periféricas, será el mayor desafío para aumentar la actividad antitumoral de la ACT sin inducir una autoinmunidad perjudicial⁴⁸.

Conclusiones

Los datos de los estudios preclínicos y de los primeros ensayos clínicos con terapias de células T adoptivas han identificado varias limitaciones principales en el contexto de los tumores sólidos:

- Dificultades en el reclutamiento de células T.
- Falta de antígenos específicos para el reconocimiento de células tumorales.
- Carencias en la proliferación y persistencia de las células transferidas y derivación de la TME inmunosupresora.

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han abordado estas limitaciones por separado. Sin embargo, el problema es tan complejo que será necesario abordar diferentes obstáculos en paralelo para aumentar la eficacia de las células T en los tumores sólidos. Un enfoque importante será la

combinación de varias modificaciones génicas en el producto celular. Gracias al rápido desarrollo de la ingeniería de células T y la tecnología de edición del genoma es factible evaluar conceptos ambiciosos y aplicar enfoques clínicos novedosos, y a menudo revolucionarios, en especial en el campo de las células CAR-T. No obstante, algunos problemas técnicos, como la menor eficiencia de transducción y transposición con el aumento del tamaño del inserto, pueden limitar el uso de células CAR-T con múltiples modificaciones. Por otro lado, el riesgo de aumentar la toxicidad de las células CAR-T con estas modificaciones combinadas hace necesario desarrollar estrategias de expresión inducibles que permitan una regulación más fina de la acción del producto celular. Un escenario prometedor es la combinación de células CAR-T y otras modalidades de tratamiento para maximizar la sinergia y abordar diferentes vías simultáneamente. Se deben explorar modelos preclínicos y mecanismos de eficacia y resistencia a la terapia con células CAR-T más apropiados. Los ensayos en curso revelarán si los novedosos enfoques de células CAR-T

beneficiarán a una población más amplia de pacientes con cáncer. Las lecciones que aprendamos de estos nuevos ensayos clínicos serán

importantes para continuar desarrollando nuevas terapias con células CAR-T para el tratamiento de tumores sólidos.

Bibliografía

1. Martin-Otal C, Navarro F, Casares N, Lasarte-Cia A, Sanchez-Moreno I, Hervas-Stubbs S, et al. Impact of tumor microenvironment on adoptive T cell transfer activity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2022;370:1-31.
2. Lanitis E, Irving M, Coukos G. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. *Curr Opin Immunol.* 2015;33:55-63.
3. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:401-10.
4. Li Y, Wang MN, Li H, King KD, Bassi R, Sun H, et al. Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis. *J Exp Med.* 2002;195:1575-84.
5. van Beijnum JR, Nowak-Sliwinska P, Huijbers EJ, Thijssen VL, Griffioen AW. The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacol Rev.* 2015;67:441-61.
6. 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. *J Clin Invest.* 2010;120:3953-68.
7. Petrovic K, Robinson J, Whitworth K, Jinks E, Shaaban A, Lee SP. TEM8/ANTXR1-specific CAR T cells mediate toxicity in vivo. *PLoS One.* 2019;14:e0224015.
8. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315:1650-9.
9. Perryman L, Erler JT. Lysyl oxidase in cancer research. *Future Oncol.* 2014;10:1709-17.
10. Keely PJ. Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16:205-19.

11. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015;348:74-80.
12. Salmon H, Franciszkievicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*. 2012;122:899-910.
13. Efthymiou G, Saint A, Ruff M, Rekad Z, Ciais D, Van Obberghen-Schilling E. Shaping up the tumor microenvironment with cellular fibronectin. *Front Oncol*. 2020;10:641.
14. Mazzolini G, Narvaiza I, Martínez-Cruz LA, Arina A, Barajas M, Galofre JC, et al. Pancreatic cancer escape variants that evade immunogene therapy through loss of sensitivity to IFN gamma-induced apoptosis. *Gene Ther*. 2003;10:1067-78.
15. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994;1:447-56.
16. Brunda MJ, Rosenbaum D. Modulation of murine natural killer cell activity in vitro and in vivo by recombinant human interferons. *Cancer Res*. 1984;44:597-601.
17. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, et al. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2003;63:4095-100.
18. Martín-Otal C, Lasarte-Cía A, Serrano D, Casares N, Conde E, Navarro F, et al. Targeting the extra domain A of fibronectin for cancer therapy with CAR-T cells. *J Immunother Cancer*. 2022;10:e004479.
19. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20:174-86.
20. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity*. 2016;45:374-88.
21. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest*. 2013;123:4479-88.
22. Brand A, Singer K, Koehl GE, Koltz M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells. *Cell Metab*. 2016;24:657-71.

23. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*. 2013;73:1524-35.
24. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, De Milito A, Ricupito A, et al. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res*. 2012;72:2746-56.
25. Pilon-Thomas S, Kodumudi KN, El-Kenawi AE, Russell S, Weber AM, Luddy K, et al. Neutralization of tumor acidity improves antitumor responses to immunotherapy. *Cancer Res*. 2016;76:1381-90.
26. Uhl FM, Chen S, O'Sullivan D, Edwards-Hicks J, Richter G, Haring E, et al. Metabolic reprogramming of donor T cells enhances graft-versus-leukemia effects in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2020;12:eabb8969.
27. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol*. 2011;226:299-308.
28. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:671-7.
29. Bosticardo M, Ariotti S, Losana G, Bernabei P, Forni G, Novelli F. Biased activation of human T lymphocytes due to low extracellular pH is antagonized by B7/CD28 costimulation. *Eur J Immunol*. 2001;31:2829-38.
30. Carswell KS, Papoutsakis ET. Extracellular pH affects the proliferation of cultured human T cells and their expression of the interleukin-2 receptor. *J Immunother*. 2000;23:669-74.
31. Navarro F, Casares N, Martín-Otal C, Lasarte-Cía A, Gorraiz M, Sarrion P, et al. Overcoming T cell dysfunction in acidic pH to enhance adoptive T cell transfer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2022;11:2070337.
32. Dai K, Huang L, Chen J, Yang L, Gong Z. Amphiregulin promotes the immunosuppressive activity of intrahepatic CD4(+) regulatory T cells to impair CD8(+) T-cell immunity against hepatitis B virus infection. *Immunology*. 2015;144:506-17.
33. Wang S, Zhang Y, Wang Y, Ye P, Li J, Li H, et al. Amphiregulin confers regulatory T cell suppressive function and tumor invasion via the EGFR/GSK-3beta/Foxp3 Axis. *J Biol Chem*. 2016;291:21085-95.
34. Zaiss DM, van Loosdregt J, Gorlani A, Bekker CP, Grone A, Sibilio M, et al. Amphiregulin enhances regulatory T cell-suppressive function via the epidermal growth factor receptor. *Immunity*. 2013;38:275-84.

35. Lozano T, Chocarro S, Martín C, Lasarte-Cía A, Del Valle C, Gorraiz M, et al. Genetic modification of CD8(+) T cells to express EGFR: potential application for adoptive T cell therapies. *Front Immunol.* 2019;10:2990.
36. Rodríguez-García A, Palazón A, Noguera-Ortega E, Powell DJ Jr, Guedan S. CAR-T cells hit the tumor microenvironment: strategies to overcome tumor escape. *Front Immunol.* 2020;11:1109.
37. Lozano T, Casares N, Lasarte JJ. Searching for the Achilles heel of FOXP3. *Front Oncol.* 2013;3:294.
38. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E, et al. Fc effector function contributes to the activity of human anti-CTLA-4 antibodies. *Cancer Cell.* 2018;33:649-63e4.
39. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:565-94.
40. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8:277-84.
41. Casares N, Rudilla F, Arribillaga L, Llopiz D, Riezu-Boj JI, Lozano T, et al. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. *J Immunol.* 2010;185:5150-9.

42. Lozano T, Casares N, Martil-Otal C, Anega B, Gorraiz M, Parker J, et al. Searching for peptide inhibitors of T regulatory cell activity by targeting specific domains of FOXP3 transcription factor. *Biomedicines.* 2021;9:197.
43. Lozano T, Gorraiz M, Lasarte-Cía A, Ruiz M, Rabal O, Oyarzabal J, et al. Blockage of FOXP3 transcription factor dimerization and FOXP3/AML1 interaction inhibits T regulatory cell activity: sequence optimization of a peptide inhibitor. *Oncotarget.* 2017;8:71709-24.
44. Lozano T, Villanueva L, Durantez M, Gorraiz M, Ruiz M, Belsue V, et al. Inhibition of FOXP3/NFAT interaction enhances T cell function after TCR stimulation. *J Immunol.* 2015;195:3180-9.
45. Suryadevara CM, Desai R, Farber SH, Choi BD, Swartz AM, Shen SH, et al. Preventing Lck activation in CAR T cells confers Treg resistance but requires 4-1BB signaling for them to persist and treat solid tumors in nonlymphodepleted hosts. *Clin Cancer Res.* 2019;25:358-68.
46. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood.* 2012;119:4133-41.
47. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.* 2019;110:2080-9.
48. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front Immunol.* 2019;10:43.