



**Universidad**  
Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado

# SÍNTESIS Y ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA CON CARTS

Autor

Alberto Martín Torres

Tutora

Sonia Santander Ballestín

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de farmacología

2015-2016

---

<b>A – Abstract – Resumen</b>	<b>2</b>
<b>B – Introducción</b>	<b>3</b>
<b>C – Material y métodos</b>	<b>3</b>
<b>1. La inmunidad tumoral</b>	<b>4</b>
1.1. La inmunoterapia tumoral en el contexto de la respuesta inmune	5
1.1.1. Anticuerpos monoclonales moduladores: “checkpoint inhibition”	6
1.1.2. Transferencia adoptiva de células T	6
<b>2. Células T transducidas con receptor de antígeno quimérico</b>	<b>7</b>
2.1. Estructura de los CARTs	8
2.1.1. Ectodominio	8
2.1.2. Dominio transmembranal y bisagras	9
2.1.3. Endodominio	10
2.2. CARTs, amigos y enemigos: diseñando el arma inmunológica definitiva	11
2.3. Requisitos para la determinación del antígeno diana	14
2.4. Elección del vector	15
2.4.1. Vectores virales: Gammaretrovirus y lentivirus	16
2.4.2. Abordajes basados en sistemas no virales: Transposones y RNA	16
2.5. Células efectoras	17
2.6. Preparación ex vivo	18
2.7. Acondicionamiento del huésped	19
2.8. Sistemas de seguridad: manteniendo los CARTs a raya en un delicado balance entre el bien y el mal	20
2.8.1. Selección del antígeno diana	20
2.8.2. Rutas alternativas de infusión	24
2.8.3. Limitación de la persistencia in vivo y la actividad de los CARTs	25
2.8.4. Sistemas de eliminación “on-demand”: iCasp9 vs tagged CARTs	25
2.8.5. Regulación de la activación: Split CAR vs iCAR	26
2.9. CARTs en el tratamiento de neoplasias hematológicas	27
2.9.1. Leucemia linfocítica crónica (LLC), Leucemia linfoblástica aguda (LLA) y Linfoma no Hodkin (LNH)	28
2.9.2. Leucemia mieloide aguda (LMA)	29
2.9.3. Mieloma Múltiple	30
2.10. CARs en el tratamiento de tumores sólidos	31
<b>D – Conclusión</b>	<b>32</b>
<b>E – Anexo 1</b>	<b>34</b>
<b>F – Bibliografía</b>	<b>36</b>

## A. Abstract

Immunotherapy has witnessed in the past decades the development of fascinating strategies in the treatment of tumours, such as the checkpoint blocking antibodies, monoclonal antibodies against cancer markers or the adoptive T cell transfer, each with its own virtues and limitations. CARTs come as an effort to combine the virtues of each one to minimize their restrictions.

In this regard, CARTs are the result of transducing autologous T cells with a chimeric protein in which we combine an extracellular recognition domain made with the variable region of a cancer-targeting antibody with intracellular T cell activation, survival and expansion motives. Therefore, an immunological weapon is created where the unsurpassable specificity and MHC-independent activity of mAbs is combined with the cytotoxic capacity of T cells.

Although this seems hypothetically flawless, only limited by the identification of the appropriate cancer antigen to be targeted, early clinical assays are beginning to show researchers the aspects that need to be improved; however, promising results, especially in the treatment of haematological malignancies, let us think that we could be on the brink of great success.

## A. Resumen

El campo de la inmunoterapia ha sido testigo en las últimas décadas del desarrollo de estrategias fascinantes para el tratamiento del cáncer, como los anticuerpos bloqueantes de “checkpoints”, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el cáncer o la transferencia adoptiva de células, cada una con sus virtudes y sus limitaciones. Los CARTs han aparecido como la promesa de combinar las virtudes de cada una de ellas para minimizar las limitaciones.

En este aspecto, los CARTs constituyen linfocitos autólogos transducidos con una proteína quimérica en la que se combinan el dominio de reconocimiento extracelular procedente de la región variable de un anticuerpo específico de un antígeno diana concreto, con motivos intracelulares de activación, supervivencia y expansión del linfocito. Así, se crea una arma inmunológica que combina la especificidad insuperable de los anticuerpos, con la efectiva acción citotóxica del linfocito T.

Pese a que, desde un punto de vista teórico, esta estrategia se antoja aparentemente perfecta solo limitada por la identificación del antígeno diana tumoral adecuado (1), los primeros ensayos clínicos empiezan a mostrar los aspectos que se deben mejorar; no obstante, resultados prometedores, especialmente en el tratamiento de enfermedades hematológicas, hacen sospechar que grandes éxitos podrían estar a la vuelta de la esquina.

## B. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer se sitúa entre las 4 principales causas de muerte natural. Pese a las grandes inversiones económicas y de recursos que se han destinado a la investigación del cáncer en las últimas décadas, los tratamientos de cánceres avanzados aún muestran una efectividad muy pobre: los pacientes con cánceres en estadios avanzados se enfrentan a tasas de remisión completa de tan solo el 5 al 10%. Pese a todos nuestros esfuerzos, estos números apenas han mejorado en las últimas 5 décadas (2) (3) (4) (5).

Hoy, esta larga búsqueda de tratamientos efectivos del cáncer ha generado una amplia gama de estrategias que están basadas en la habilidad de impedir la replicación, crecimiento y señalización celular, pero desde hace un tiempo se sospecha que el éxito en última instancia de estas terapias se basa en la inducción de una respuesta inmunológica antitumoral (6). Si éste es el caso y el sistema inmunológico es en efecto la clave para poder vencer al cáncer, no es ninguna sorpresa que la revista (7) Science decidiese nombrar la inmunoterapia del cáncer el avance científico del año 2013 (8). Esta disciplina nació hace más de un siglo a manos de un cirujano (9), pese a esto, Science admite que aún hoy se encuentra en una etapa inicial y desde 2013 este campo ha parecido estallar.

En esta revisión bibliográfica nuestro objetivo es tratar una de las más prometedoras inmunoterapias: los linfocitos T transducidos con receptores de antígeno quiméricos (CARTs según sus siglas inglesas). Para ello, primero empezaremos por describir brevemente la respuesta inmune antitumoral y el escape inmunitario del tumor con tal de proporcionar el contexto en el que describir las inmunoterapias antitumorales más relevantes y que sentaron los fundamentos para el desarrollo de los CARTs. A continuación, describiremos los CARTs con detalle, enumerando sus pros y sus contras, mencionando brevemente el estado clínico en el que se encuentran actualmente y describiendo su desarrollo para poder así explicar las funciones que se les otorgan y las que potencialmente se les puede atribuir gracias a la biología sintética.

## C. Material y métodos

Se ha realizado una revisión sistemática de artículos consultando las bases de datos de Pubmed y la fundación Clínic de Barcelona. Se acotó la búsqueda bibliográfica entre los años 1975 y 2016 especialmente basándose artículos publicados en los últimos cinco años, por otro lado la búsqueda se centró en artículos de revisión, casos clínicos y ensayos clínicos. Utilicé como palabras clave: lymphocyte, immunotheapy, Chimeric antigen receptor, antibodies resultando un total de 307 artículos de los cuales se revisaron los abstracts de los que resultaban relevantes a esta revisión de artículos. Se seleccionaron 97 artículos de los cuales se dedujo la estructura, función, síntesis y aplicaciones de los CARTs.

## 1. La inmunidad tumoral

En la actualidad, nuestro extenso conocimiento de la respuesta inmune ha permitido vislumbrar los mecanismos que permiten a nuestro sistema inmune luchar contra las neoplasias así como aquéllos que podrían fallar e incluso ser usados por el tumor a su favor. Pese a que aún queda mucho por descubrir, los conocimientos acumulados en este campo hasta la fecha nos han permitido desarrollar una amplia gama de estrategias posibles que pueden ser adoptadas potencialmente.

Se ha observado que, en última instancia, es una respuesta robusta y duradera por parte de los linfocitos T citotóxicos la herramienta indispensable para que el sistema inmune sea capaz de controlar y erradicar el tumor. Ésta se inicia con el papel crucial de la presentación antigénica. En ella, las células dendríticas (CDs) (10) (11) (12) son las principales encargadas al ser las células presentadoras de antígenos más eficientes y las únicas capaces de activar directamente y con robustez a las células T CD8+ mediante cros-presentación.

Con tal de que las CDs presenten y activen adecuadamente los linfocitos, éstas deben capturar el antígeno en un ambiente inflamatorio, de lo contrario, la presentación del antígeno puede llevar a tolerización o anergia de los linfocitos (13). Tal ambiente es en efecto generado por los tumores (14): se activa la vía pro-inflamatoria del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y se liberan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento incluido el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) (15). Además, las células necróticas y apoptóticas, que forman habitualmente parte del tumor, liberan ATP, proteínas de choque térmico, urato monosódico y proteínas de alta movilidad las cuales ayudan a promover el ambiente pro-inflamatorio (16).

No obstante, en el fenómeno denominado inmunoedición, la presión que la respuesta inmune ejerce sobre la población celular tumoral favorece la proliferación de células tumorales capaces de eludir la respuesta inmunitaria (17). Por ejemplo, el tumor es capaz de empezar a generar un ambiente inmunosupresor mediante secreción paracrina, incluyendo la secreción de: interleucina 10 (IL-10), factor de crecimiento transformante beta (TFG- $\beta$ ), prostaglandina E2 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (18) (19). Éstos son capaces de dificultar e impedir la respuesta inmune a diferentes niveles. Es más, las células tumorales son capaces de expresar en su superficie ligandos del sistema inmunitario como el ligando-1 de muerte programada (PD-L1), antígeno 4 de linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el ligando de fas (Fas-L), todos ellos capaces de inducir anergia de linfocitos T, apoptosis y su agotamiento (20). Además, el estroma tumoral, compuesto por las células no tumorales pero que dan soporte al tejido tumoral, provee al tumor con nutrientes y un ambiente paracrino favorable para su proliferación así como para la inmunomodulación (21) (22). Los fibroblastos asociados al tumor secretan las quimiocinas CCL2 y CXCL12 las cuales atraen células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSCs), un tipo celular capaz de inducir una fuerte inmunosupresión. La hipoxia tisular lleva a la producción de CCL28 que a su vez atrae linfocitos T reguladores, otra subpoblación linfocitaria encargada de frenar el sistema inmunitario. Además, en el tumor también se

favorece la diferenciación alternativa de los macrófagos a macrófagos M2, los cuales desarrollan funciones antiinflamatorias produciendo la síntesis de óxido nítrico inducible (iNOS), arginasa derivada de célula mielóide, lactato deshidrogenasa-A e indolamina-2,3-dioxigenasa, las cuales también dificultan el desarrollo de una respuesta inmune adecuada (23). Las moléculas más importantes se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Molécula	Función en el sistema inmune
<i>IL-10</i>	Citocina antiinflamatoria
<i>TFG-β</i>	Promotor de linfocitos reguladores
<i>PD-L1</i>	Induce Apoptosis
<i>Fas-L</i>	Induce Apoptosis
<i>CTLA-4</i>	Induce Apoptosis
<i>CCL2</i>	Atrae células mieloides (inmunosupresoras)
<i>CXCL12</i>	Atrae células mieloides (inmunosupresoras)
<i>CCL28</i>	Atrae Linfocitos T reguladores (inmunosupresores)
<i>iNOS</i>	Dificultan el desarrollo de la respuesta inmune
<i>Arginasa</i>	Dificultan el desarrollo de la respuesta inmune
<i>LDH-A</i>	Dificultan el desarrollo de la respuesta inmune

**Tabla 1. Principales citocinas secretadas en el ambiente tumoral**

En este ambiente, las células dendríticas deben ser capaces de captar antígenos tumorales y migrar entonces a los órganos linfoides secundarios donde no solo deben presentar adecuadamente los antígenos, sino también proporcionar las señales secundarias y terciarias apropiadas en forma de ligandos coestimuladores y citosinas, las cuales no se proporcionan de forma correcta si la CD ha captado el antígeno en un ambiente inmunosupresor.

Tras la activación de los linfocitos cognatos, los linfocitos efectores (tanto citotóxico CD8+, como cooperadores CD4+) deben migrar al tumor donde ejercer su función. Pero una vez allí, los linfocitos se encontrarán una vez más con este microambiente generado por el tumor que jugará en su contra; por ejemplo, se ha observado una robusta correlación entre la elevada presencia de linfocitos T reguladores con un mal pronóstico (24).

### 1.1. La inmunoterapia tumoral en el contexto de la respuesta inmunitaria

El término inmunoterapia se refiere a cualquier tipo de tratamiento que se base en la manipulación de nuestro sistema inmune ya sea aumentando su actividad, suprimiéndola o modulándola. Hace más de un siglo, los primeros intentos de inmunoterapia del cáncer se llevaron a cabo de manos un cirujano, William B. Coley. Él fue testigo de la remisión completa aparentemente milagrosa de un sarcoma recurrente tras la aparición de una infección en el lugar del tumor tras un intento fallido de eliminar el tumor. Coley sugirió que la respuesta inmune provocada por la infección había sido la encargada de eliminar también el tumor. Entonces, a principios del siglo XX, Coley desarrolló una vacuna utilizando extractos bacterianos inmunogénicos con el objetivo de suscitar una respuesta inmune para tratar el cáncer.

Hoy en día, una amplia gama de inmunoterapias tumorales han sido desarrolladas con más o menos éxito. Dos de estas terapias, concretamente los anticuerpos monoclonales y la transferencia adoptiva de células T, se pueden considerar la base de la terapia con CARTs, actualmente uno de los campos más prometedores en la inmunoterapia del cáncer. Así pues, trataremos estas dos inmunoterapias antes de sumergirnos en el mundo de la inmunoterapia con CARTs:

### **1.1.1. Anticuerpos monoclonales moduladores: “checkpoint inhibition”**

Los últimos esfuerzos en terapia con anticuerpos monoclonales (25) se han centrado en el desarrollo de anticuerpos capaces de bloquear la acción de moléculas de superficie inhibitoras del sistema inmunitario, tales como CTLA-4 y PD-L1 (26,12). De esta forma, se busca eliminar el freno que estas moléculas ponen a la respuesta inmunitaria, permitiendo que se desarrolle una respuesta inmune más agresiva y efectiva, pese a los efectos indeseados que esto puede suponer.

Siguiendo esta estrategia, Ipilimumab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA, habiéndose convertido ya en la primera línea de tratamiento para el melanoma metastásico.

De forma similar, la caracterización de antígenos asociados o específicos de tumor nos permite producir anticuerpos monoclonales específicos para tales antígenos y que por lo tanto son capaces de inducir muerte de las células tumorales a través de la activación de la citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El mayor reto en este caso se centra en la identificación de tales antígenos (1). Un caso clásico es el uso de Rituximab en neoplasias B, donde el marcador CD20 es utilizado como diana para atacar las células neoplásicas.

### **1.1.2. Transferencia adoptiva de células T**

La inmunoterapia tumoral mediante transferencia adoptiva de células T se puede resumir como la inoculación del paciente con células T inmunológicamente reactivas capaces de mediar una respuesta anti-tumoral ya sea directa o indirectamente (27) (28).

Estas células se obtienen preferentemente del propio paciente para reducir el rechazo o la enfermedad del injerto contra el huésped, de diferentes fuentes (por ejemplo, directamente del interior de tejido tumoral, lo que se conocen como linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), o de tejidos periféricos mediante leucoféresis). A continuación, se expanden *in vitro* donde son además estimulados para aumentar su actividad frente la inmunosupresión inducida por el microambiente tumoral. Una vez que han sido activadas adecuadamente son reinoculadas en el paciente.

La primera aproximación que se llevó a cabo en este campo, conllevaba la obtención de células mononucleares de sangre periférica, su activación y expansión *in vitro* de forma inespecífica, utilizando para ello elevadas dosis de interleucina-2 (IL-2) antes de reinyectarlas en el paciente, el cual también recibía una alta dosis de IL-2. A estas células se las llamó asesinas activadas por linfoquina (LAKs) (29) (30). Pese que se observaron ciertas

respuestas, la administración de elevadas concentraciones de IL-2 necesarias para la efectividad del tratamiento, iba acompañada de serias reacciones adversas que no podrían ser tolerados por la mayoría de pacientes oncológicos avanzados.

La observación de que aquellos tumores sólidos que contenían infiltrados inflamatorios con células inmunitarias se correlacionaban con un mejor pronóstico, proporcionó otra maniobra en la obtención de linfocitos. A estos linfocitos se les llamó linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), y se las aclamó como las células efectoras más efectivas que el sistema inmune podía producir para combatir el cáncer. No obstante, el ambiente inmunosupresor del tumor prevalece sobre la eficacia de los TILs y al poco de acceder al tumor, estas células tienden a entrar en un estado de anergia que no es reversible bajo condiciones fisiológicas *in vivo*. Así, en un intento de asistir al sistema inmunitario, se aislaban los TILs y se reestimulaban *in vitro* bajo condiciones que pudieran revertir este estado de anergia. Los resultados de los primeros ensayos en humanos con melanoma metastático mostraron algunos de los mejores resultados obtenidos mediante inmunoterapia hasta la fecha (31). No obstante, los TILs se presentan habitualmente en una proporción muy reducida en muchos tumores, su obtención es difícil, costosa, consume mucho tiempo y difícil de estandarizar. Con tal de aumentar su eficacia, los pacientes deben someterse a una linfoablación, un procedimiento altamente arriesgado, especialmente para pacientes oncológicos. Y finalmente, no debemos olvidar el ambiente inmunosupresor del tumor capaz de volver a revertir la activación de los linfocitos e inducirles una vez más un estado de anergia.

## 2. Células T transducidas con receptor de antígeno quimérico: CARTs

Nuestro conocimiento cada vez mayor de los sistemas biológicos ha acunado el nacimiento de la biología sintética, un campo multidisciplinar que nos permite adoptar la función de los sistemas biológicos y reconfigurar sus vías mejorando su rendimiento y aumentando su efectividad a través de la manipulación de los elementos genéticos de la célula (32).

¿Qué es un CART? Un CART es un linfocito T al que se le ha asociado un receptor quimérico (CAR) diseñado genéticamente y específico para reconocer y actuar frente a un antígeno determinado. Y esto ha sido una de las mayores hazañas que ha resultado de los esfuerzos en esta disciplina. La primera generación de CARs surgió hace dos décadas. Éstas eran proteínas de membrana de fusión que incluían: un dominio extracelular compuesto por un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo específico para el antígeno deseado, y un dominio intracelular con una secuencia de señalización capaz de activar la célula tras el reconocimiento antigénico. Concretamente esta secuencia se corresponde con el dominio de señalización ITAM de la subunidad CD3 $\zeta$  del receptor de célula T (TCR). No obstante, los primeros linfocitos transducidos con estos CARs de primera generación mostraban una pobre expansión *in vivo* así como una persistencia muy reducida, todo ello llevando a una actividad antitumoral muy limitada. (33)



Hoy, nuevas generaciones de CARs se han desarrollado ofreciendo una amplísima de ventada de posibilidades y estrategias. Caben destacar, los CARs de segunda generación los cuales incluyen además en el dominio intracelular un segundo motivo, aparte de CD3 $\zeta$ , como CD28 o 4-1BB, que han demostrado aumentar efectivamente la proliferación y persistencia *in vivo*. Tercera y cuarta generación de CARs ya han sido introducidas incluyendo más de un módulo de coestimulación, así como secuencias que capacitan a este receptor con otras funciones. Las posibilidades son ilimitadas, pero los obstáculos que se deben superar son también numerosos.

## 2.1 Estructura de los CARTs

Tal y como se ha descrito anteriormente, la eficacia del CAR radica en nuestra habilidad de combinar diferentes módulos moleculares funcionales dentro de la estructura de estas proteínas de fusión. La estructura de los CARs se puede desglosar en 4 partes diferenciadas: el ectodominio o dominio extracelular, el dominio bisagra, el dominio transmembrana y el endodominio o dominio intracelular. Cada dominio tiene un impacto en la función del CAR y por lo tanto su composición debe ser decidida meticulosamente (32).

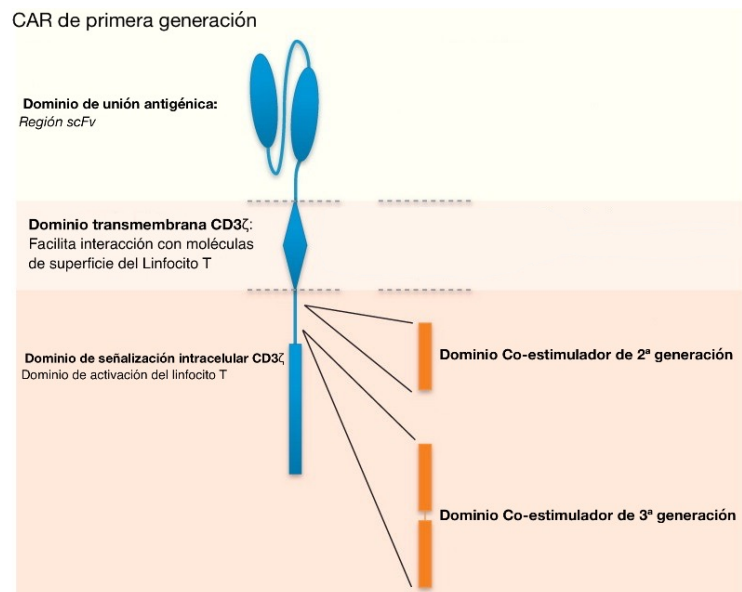


Figura 1. Esquema Básico de la estructura de un CAR

Adaptado de Gilham, DE 2012 (104)

### 2.1.1 Ectodominio

Se trata de un anticuerpo responsable en última instancia del reconocimiento del antígeno. Una vez el antígeno diana ha sido seleccionado es necesario identificar anticuerpos específicos para este antígeno con tal de determinar la secuencia variable exacta de la cadena pesada y la ligera de estos anticuerpos, transformarlas en una secuencia de una sola cadena e incorporarla en la secuencia del CAR. Cabe mencionarse que se desconoce el mecanismo exacto por el cual, tras la interacción de la región scFv con el antígeno, se transduce la señal activadora al endodominio para iniciar las cascadas de señalización. Se ha sugerido que podría entrar en juego el cross-lincaje de la molécula CAR con el complejo TCR nativo del linfocito para llevar a cabo la activación, no obstante, aún no existen pruebas concluyentes.

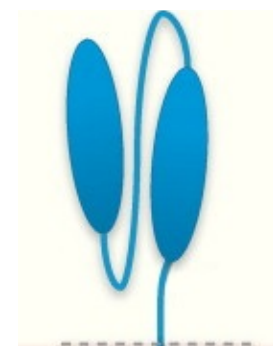


Figura 2. Región scFV del ectodominio del CAR

Adaptado de Gilham, DE 2012 (104)

Una observación significativa a tener en consideración es que la posición del epítipo sobre la proteína de membrana diana tiene un impacto sobre la eficiencia citotóxica del CART sobre la célula tumoral. Así pues, se ha descrito una relación directamente proporcional entre la cercanía del epítipo a la membrana plasmática tumoral y la efectividad de la actividad citotóxica del CART.

Alternativamente, se han sugerido otras alternativas al uso de regiones scFv como dominio de interacción con la diana. Así, una opción es el uso de un receptor o ligando conocido para una proteína diana específica. Por ejemplo, se han diseñado CARTs dirigidos contra IL13R $\alpha$ 2 utilizando una molécula CAR cuya porción extracelular estaba compuesta por la secuencia de la IL-13.

Otra estrategia utilizada en este sentido se basaría en el sistema estreptavidina-biotina. En este caso, el ectodominio del CAR sería el de la estreptavidina, una proteína capaz de unirse con gran avidez a la biotina. Así, el simple uso de un anticuerpo monoclonal biotinilado específico para un antígeno tumoral sería suficiente para marcar la célula diana y guiar al CART hacia ésta. El estreptavidin-CART patrullaría el organismo del individuo hasta encontrar el anticuerpo-biotinilado con el que interactuaría desplegando su actividad citotóxica sobre la célula a la que el anticuerpo biotinilado estuviese adherido. De esta forma, el CAR utilizado sería exactamente el mismo para todos los casos, con el ahorro de tiempo y recursos que conllevaría al no tener que diseñar y generar un CAR específico para cada neoplasia. Lo único que debería generarse en cada caso específico sería el anticuerpo monoclonal, la obtención de cual requeriría mucho menos tiempo y recursos.

Finalmente, otra alternativa es incorporar CARs con más de una región scFv en tandem, tanCAR, cada una con especificidad para diferentes antígenos. Los tanCARTs tendrían predisposición a destruir las células que presentasen los dos antígenos en su superficie a la vez, de tal forma que estos antígenos se presentan de forma fisiológica en otros tejidos pero solo por separado, siendo las células tumorales las únicas en co-expresarlos, limitando así la toxicidad fuera del tumor. No obstante, aunque la posibilidad de que las células malignas de un tumor co-expresen moléculas antigénicas diferentes, dada la inestabilidad del genoma de éstas, es fácil que escapen del tanCAR mediante la aparición de clones que dejen de expresar uno o los dos antígenos.

### **2.1.2 Dominio transmembranal y bisagras**

En un inicio se consideró que tanto la región bisagra como el dominio transmembranal del receptor quimérico debían desempeñar una función que iba poco más allá de la estructural, numerosos estudios han demostrado que, en efecto, desempeñan un papel importante en la actividad del CAR. Tanto la longitud y composición de ambas regiones se ha demostrado que mejora o modula la activación del CART. Pese a ello, poco se conoce del mecanismo tras este fenómeno. En este aspecto, una de las observaciones más enigmáticas es que una construcción de bisagra concreta puede mejorar la actividad antitumoral del CART para una determinada neoplasia, pero reducir considerablemente su efectividad en otra pese a que presenten el mismo antígeno diana. Por ejemplo, el uso de

una bisagra CH2CH3, (dominios de la cadena pesada de inmunoglobulinas) aumenta el rendimiento del CAR anti-CD19 (34), respecto a CARs sin bisagra, mientras que el uso de esta bisagra reduce el rendimiento de CARs anti antígeno carcinoembrionario y de molécula de adhesión neural pequeña (N-CAM). En otros casos, como es el caso del CAR anti-ROR1, la adición de una bisagra pero más corta (12 aminoácidos) presenta una mejora respecto la bisagra de CH2CH3 o la ausencia de bisagra.

Pese a todos los esfuerzos empleados, aún no se han identificado las variables que determinan la efectividad en de una secuencia del dominio transmembrana y bisagra u otra, así que la elección de la misma se basa enteramente en testar las diversas opciones en ensayos preclínicos.

### 2.1.3 Endodominio

Esta región se encarga de desencadenar la activación celular tras la interacción del CAR con el antígeno. Para ello, el endodominio debe contener la secuencia consenso de motivo de inmunoreceptor de activación basado en tirosina (ITAM), como es el caso del dominio intracelular de CD3 $\zeta$ . Se ha probado como alternativa la secuencia del receptor de Fc de IgEg pero los resultados han sido menos eficientes, por lo que se prefiere la secuencia ITAM del receptor CD3 $\zeta$ .

No obstante, el dominio ITAM de CD3 $\zeta$  por sí sólo no es suficiente para inducir la expansión y persistencia del linfocito T efector, y por ello los CARTs de primera generación, pese a ser capaces de activarse y degranular frente al encuentro con antígeno, acababan por perder efectividad al no expandirse y persistir en el individuo. Es aquí donde los CARs de segunda y tercera generación entran en juego, a través de la adición de uno o dos motivos respectivamente. En un principio los CARs de segunda generación se diseñaron para proporcionar señales de proliferación, y los de tercera generación además introducían motivos de supervivencia. Entre los módulos testados se encuentran los dominios intracelulares de CD28, OX40, 4-1BB. Éste último ha demostrado ser capaz de proporcionar ambas señales: tanto supervivencia como proliferación, reduciendo así la complejidad de la estructura sin reducir por ello su eficiencia. Además, pese a que se ha probado tanto la eficiencia preclínica (35) (36) como clínica (37) (38) (39) (40) tanto del uso de CD28 como de 4-1BB, se ha demostrado que el motivo CD28 conllevaba un agotamiento prematuro de los linfocitos T , mientras que 4-1BB no promovía este efecto.

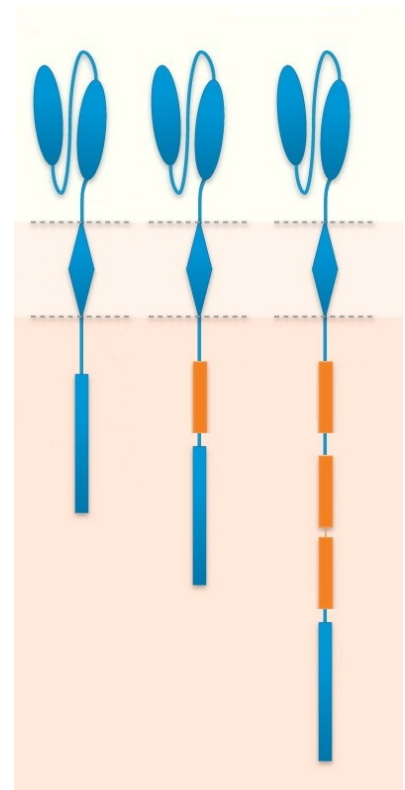


Figura 1. De izquierda a derecha, CARs de primera, segunda y tercera generación.

Adaptado de Gilham, DE 2012 (104)

Tal y como comentábamos, la gran expansión de la biología sintética ha dado rienda suelta a la ingeniería de los investigadores; así, se han trazado otras estrategias mediante las que el dominio intracelular del CAR es capaz de inducir otras funciones más allá de la activación y actividad citotóxica del linfocito. Un ejemplo sería la incorporación de dominios de señalización que inducen la producción masiva de citosinas, como la IL-12, por parte del linfocito que combatirían y revertirían el ambiente inmunosupresor del tumor descrito anteriormente (41). Esta es una estrategia que se tratará con más detalle en el abordaje de la adaptación de la inmunoterapia con CARTs a los tumores sólidos en concreto, pero además las posibilidades que se abren ante tal versatilidad permiten que los CARTs puedan ser usados en el caso opuesto al de las neoplasias, como serían las enfermedades autoinmunes (42) . De esta forma, se ha propuesto el desarrollo de CARTs capaces de producir TGF- $\beta$  para inducir tolerancia y revertir la activación de linfocitos autoreactivos. Éste es un campo totalmente experimental pero que demuestra el enorme potencial de la terapia con CARTs y que también cubriremos más adelante.

## 2.2 CARTs, amigos y enemigos: diseñando el arma inmunológica definitiva

Una de las grandes ventajas de la terapia con CARTs es el hecho de que la actividad citotóxica antitumoral específica de antígeno que ejercen es independiente de HLA. Se ha observado en células tumorales de reducir la expresión de HLA clase-I así como de menguar la presentación antigénica en contexto de HLA clase-I mediante la acumulación de defectos en la vía de procesamiento antigénico. Esto permite al tumor escapar de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ del paciente, pero no de la de los CARTs al ser su reconocimiento del antígeno independiente de la presentación por HLA. (33)

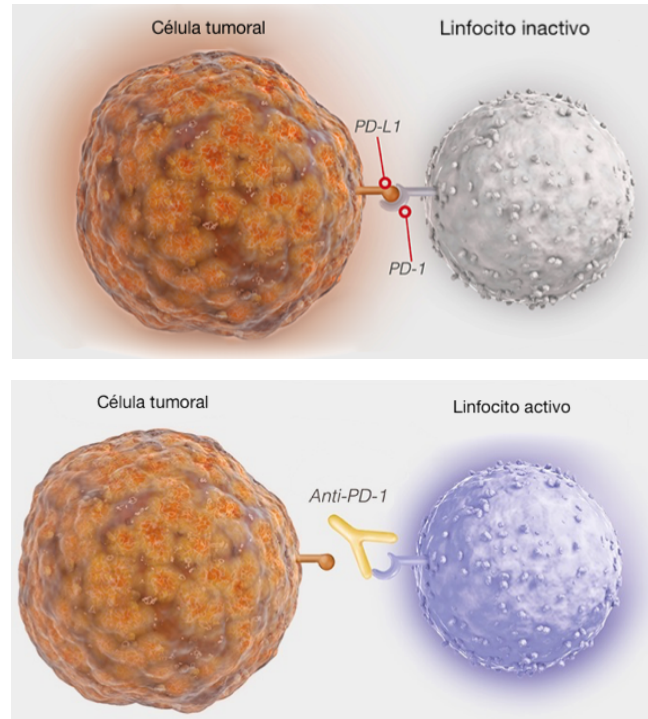
Otro beneficio del uso de los CARs es la mayor avidéz y especificidad que presenta la región scFv en su interacción con el antígeno diana, respecto a la avidéz con la que interaccionan los TCR.

Muchos ensayos clínicos han demostrado ya la efectividad de la terapia con CARTs, y se está convirtiendo en una estrategia cada vez más popular, especialmente en el tratamiento de neoplasias hematológicas (43) (44), en las cuales se han conseguido los mejores resultados hasta el momento. En este campo, más de una docena de ensayos clínicos se han realizado, reportándose respuestas objetivas en todos los grupos, incluyendo remisiones completas duraderas.

Puesto que la terapia con CARTs se encuentra aún en una etapa muy joven, no existen protocolos pre-establecidos y por lo tanto cada uno de los múltiples centros que han publicado sus resultados en este campo han utilizados abordajes al diseño experimental que difieren a diversos niveles: desde el diseño del constructo genético del CAR hasta los protocolos de administración, dosis, así como fármacos co-administrados y tratamientos de acompañamiento como el trasplante de médula ósea (43).

Pese a sus diferencias, estos primeros estudios han allanado el camino para la obtención de las primeras conclusiones. Una de las lecciones más valiosas que hemos aprendido es que la eficacia de los CARTs depende en gran medida en el tipo de neoplasia, incluso cuando el antígeno diana es el mismo. Éste sería el caso de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia linfocítica crónica (LLC), ambas, enfermedades linfoproliferativas B en el que el antígeno diana es el marcador CD19 (34). No obstante, ALL muestra tasas de respuesta mucho mayores que LLC.

Uno de los más complejos pero importantes aspectos a abordar es el microambiente tumoral del que hemos hablado y sus efectos potenciales en la actividad de los CARTs. Por ejemplo, se sabe que los CARTs expresan en su superficie la proteína PD-1 y por lo tanto son vulnerables de ser inhibidos por su ligando PD-L1 el cual es expresado en numerosas ocasiones por las células tumorales (45), y, pese a que el tratamiento combinado con anticuerpos bloqueantes de PD-1 ya se están evaluando, éste es uno de los numerosos ejemplos, conocidos y aún por conocer, de cómo las células tumorales pueden actuar para abrogar la función de los CARTs.



**Figura 4. Arriba Interacción PD-L1 tumoral con PD-1 inactivando linfocito. Abajo Anticuerpo Anti PD-1 impide inactivación linfocitaria por PD-L1 tumoral.**

Adaptado de Di Stasi 2011 (102)

Los primeros ensayos han dejado claro que los mejores resultados obtenidos se correlacionaban con niveles elevados de expresión de la molécula CAR en la superficie de los CARTs previos a la inoculación, junto con una expansión *in vivo* amplia y persistente. Con tal de obtener un injerto adecuado de los CARTs, se ha observado que, en lugar de inocular un mayor número de células, llevar a cabo una linfodepleción previa del paciente conduce a una mayor expansión de los CARTs favorecida por la homeóstasis del sistema inmune (46).

Pero, en el otro lado de la misma moneda, debemos tener en cuenta los efectos adversos que conlleva desplegar todo el potencial citotóxico de las células T. Uno de los efectos adversos más obvio es la citotoxicidad "on-target off-tumour" esperada cuando el antígeno diana se halla presente en otros tejidos diana o también cuando existe una proteína en células del cuerpo con una región similar al epítipo concreto del antígeno contra el que se dirige el CART. Por ejemplo, el uso de CARTs anti-CD19 para el tratamiento de neoplasias B, tales como LLA y LLC (34), conlleva una aplasia de células B lo cual conduce a una clara inmunodeficiencia humoral en el paciente.

Además, también podemos esperar toxicidad "on-target", incluyendo síndrome de liberación de citocinas (SLC) y de lisis de tumor (SLT). El SLT es un efecto adverso común del tratamiento tumoral ya sea quimioterapia o radioterapia producido por la liberación masiva de elementos del interior celular cuando las células tumorales mueren de forma masiva, para el cual existen tratamientos efectivos para tratar sus efectos.

Por otra parte, el SLC, la aparición del cual suele ser señal de que la inmunoterapia con CARTs está funcionando con éxito, ha demostrado ser más complicado de tratar que el SLT y el causante de las únicas muertes que se han producido en ensayos clínicos con CARTs hasta la fecha.

Las primeras opciones terapéuticas para manejar este grave efecto adverso ya han aparecido, entre las que se incluye el uso de anticuerpos bloqueantes del receptor de IL-6, aunque existe debate en torno a la necesidad de permitir el desarrollo controlado del CRS para asegurar que los CARTs puedan desplegar todo su potencial.

Es posible utilizar vectores virales para integrar el gen CAR en el genoma de las células, sin embargo esto presenta el riesgo teórico de inducir una transformación malignizante en las células. No obstante, ensayos realizados hace más de una década en pacientes infectados con VIH con el CAR CD4ζ han demostrado que no se ha producido tal transformación en ninguno de los sujetos de estudio. Otra observación interesante y esperanzadora que se desprende de tales estudios es que 10 años después, los pacientes aún presentan niveles detectables de CARTs memoria y CARTs efectores.

Otro asunto que preocupa con el uso de los CARTs es la posibilidad de un rechazo por parte del huésped si se diese el caso de que una respuesta inmune adaptativa se pudiese desplegar contra la propia molécula CAR al no ser una molécula propia del individuo. Así, debemos tener en cuenta que pese a que nuestro sistema inmunológico está diseñado para generar tolerancia contra los antígenos que se correspondan con moléculas propias y pese a que el CAR es un mosaico de moléculas que en principio son de origen humano, las regiones en las que se produce el empalme entre un dominio y otro de la quimera tendremos secuencias ajenas y por lo tanto susceptibles de desarrollar inmunogenicidad. Lo mismo ocurre con la región variable, scFv.

Algunos de los ensayos fallidos con CARs de primera generación mostraron que algunos de estos pacientes presentaban en su suero anticuerpos anti-CAR los cuales eran capaces de unir la porción variable de la molécula neutralizándola e impidiendo su interacción con el antígeno diana, incluso provocando una respuesta citotóxica versus el CART equivalente a la que el CART debe ejercer sobre la célula tumoral para destruirla. No obstante, los nuevos CARTs se diseñan con secuencias lo más similares al ser humano posibles con tal de reducir su inmunogenicidad.

### 2.3 Requisitos para la determinación del antígeno diana

Uno de los mayores retos, sino el mayor, gira entorno a la identificación del antígeno diana adecuado (47) pues debe cumplir una serie de requisitos, algo realmente difícil de encontrar:

1. Debe ser un antígeno que esté ausente en tejidos vitales incapaces de tolerar el ataque citotóxico colateral de los CARTs. En este sentido cabe destacar los dos tipos de antígenos que podemos catalogar: los antígenos asociados a tumor y los antígenos específicos de tumor. Los antígenos asociados a tumor son aquellas moléculas que están expresadas de forma diferencial, aunque no exclusiva, por las células tumorales, de forma que, aunque el antígeno se encuentre en otras células del organismo, el tumor las expresa a niveles aberrantes, generalmente muy superiores a los niveles fisiológicos, convirtiéndose en una potencial diana de terapia. Los antígenos específicos de tumor, son aquellas moléculas que no están expresadas en el resto de tejidos no inmunoprivilegiados del individuo estos tejidos tienen la capacidad de contener múltiples mecanismos que sirven para suprimir un ataque citotóxico sobre las células y antígenos propios que se encuentran en estos sitios inmunoprivilegiados. (47)
2. Esto puede ser el resultado de la expresión aberrante de proteínas debido a mutaciones del genoma tumoral, o a la activación de la expresión de genes que el organismo solo expresa en etapas embrionarias o en zonas inmunoprivilegiadas como serían las gónadas.
3. El antígeno debe corresponder a una molécula esencial para la célula tumoral, de lo contrario, como consecuencia del fenómeno de inmunoección, se favorecería la proliferación de clones tumorales que no expresasen el antígeno, conduciendo al escape inmunológico del tumor.
4. El antígeno debe estar expresado en la superficie celular. Puesto que el CAR reconoce antígenos sin la necesidad de su presentación por HLA, cualquier molécula no expuesta al medio extracelular quedaría fuera del alcance de éstos. En un intento por evitar este condicionamiento, se han diseñado CARs que reconocen específicamente el antígeno en el contexto de presentación de HLA como lo haría un TCR clásico (7) (48), no obstante, siendo el HLA la molécula más polimórfica del ser humano, la efectividad de esta estrategia podría verse seriamente limitada por el haplotipo HLA de cada individuo.
5. El antígeno diana no debe liberarse al torrente sanguíneo, donde, en su forma soluble, pueda entrar en contacto con el receptor del CAR llevando, o a una activación inespecífica o simplemente a la neutralización de éste impidiendo que posteriormente se pueda interactuar con el antígeno en membrana.



## 2.4 Elección del vector

Con tal de introducir el gen que codificará para el CAR dentro de los linfocitos T obtenidos del paciente e inducir su expresión en membrana, existen diferentes estrategias, cada una con sus pros y sus contras, y que describiremos a continuación:

### 2.4.1 Vectores virales: gammaretrovirus y lentivirus

Los adenovirus recombinantes y los adeno-asociados han sido históricamente los principales vectores empleados en la investigación de la terapia génica humana que implica la transducción de células de origen no hematopoyético. No obstante, aunque los virus adeno-asociados pueden mediar la integración selectiva específica de un punto concreto del genoma, esto no se ha conseguido en el caso de los linfocitos T. Para las terapias basadas en linfocitos, los lentivirus y gammaretrovirus han demostrado ser los vectores más efectivos para la inducción génica duradera gracias a su capacidad de integrar el gen dentro del genoma de la células huésped (49), lo que conlleva una expresión permanente del transgen (gen transferido al linfocito), incluso a medida que la célula huésped se multiplica. Además estos vectores presentan una inmunogenicidad intrínseca muy reducida. Existe riesgo teórico de mutagénesis inducida por la inserción del transgen en el genoma que podría suceder, por ejemplo, si el transgen se introdujese en medio de una proteína reguladora del ciclo celular interfiriendo así en la maquinaria de regulación del ciclo celular (50), pese a ello, los ensayos clínicos con vectores lentivirales que se iniciaron a principios de la década pasada demostraron que aunque la terapia no fue efectiva (se trataba de linfocitos transducidos para tratar VIH), hoy día ninguno de los pacientes (que aún presentaban las células transducidas en su organismo) desarrolló ningún tipo de neoplasia relacionada con la modificación genética de estas células (51) (52) (53).

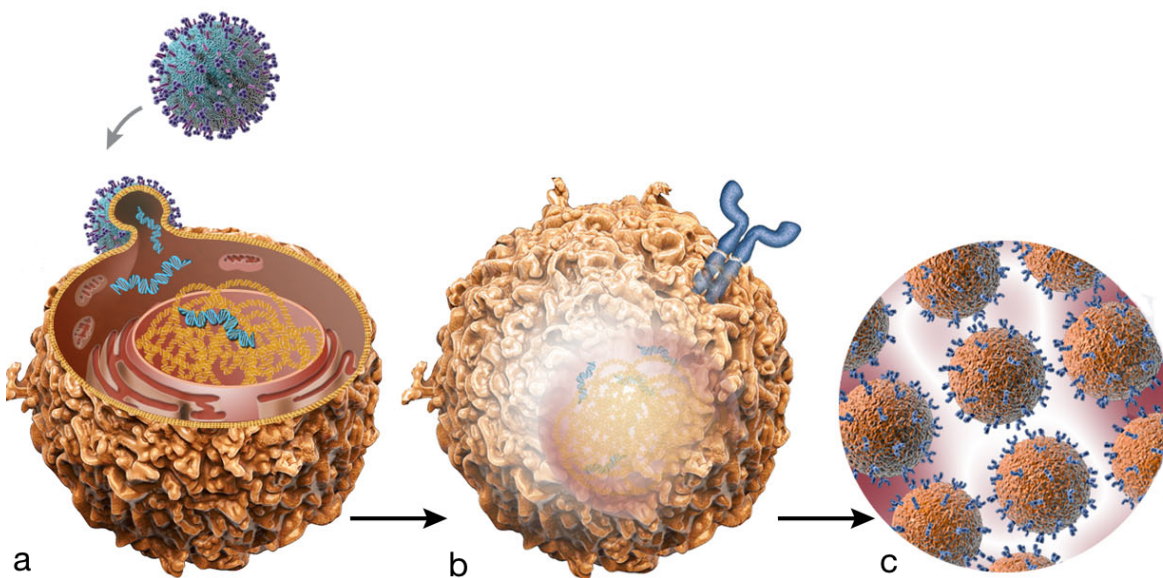


Figura 5. a. Virus vector transfiere el ADN al Linfocito T del paciente. b. Linfocito T expresa el CAR específico. c. expansión de Linfocitos T ex vivo

Adaptado de Haemalogix 2016 (103)



Mientras que los gammaretrovirus solo pueden infectar, y por consiguiente injertar el transgen, en células en estado replicativo, los lentivirus pueden infectar células en estado quiescente o fase  $G^0$ . Además, los lentivirus son mucho menos susceptibles al silenciamiento por los factores de destrucción del huésped.

Por el contrario, el uso de los vectores lentivirales es mucho más complejo a nivel de manufacturación y conlleva un coste mucho más elevado, una variable que se antoja como uno de los mayores factores limitantes de la inmunoterapia con CARTs.

## 2.4.2 Abordajes basados en sistemas no virales: Transposones y RNA

Como alternativa a la transducción, surge la electrotransfección la cual consigue introducir en una célula material genético mediante electroporación, es decir, la inducción efímera mediante pulsos eléctricos de poros en la membrana citoplasmática por los que accedería nuestro gen. No obstante, esta técnica se ha considerado ineficiente pues requiere de herramientas de recombinación adicionales para conseguir la inserción genómica estable del material genético. Como consecuencia, con esta técnica se consigue una tasa de transducción génica muy baja, por lo que se requeriría de una posterior selección in vitro de las células T que han sido transfectadas de manera estable. Además, al someter las células a pulsos eléctricos se compromete su viabilidad conduciendo a muchas de ellas a una muerte prematura.

La eficiencia de integración puede incrementarse considerablemente mediante el uso de sistemas transposón/transposasa como sería el caso de los sistemas “*Sleeping beauty*” y “*piggyBac*”. En el caso del sistema “*Sleeping beauty*”, las células son transducidas con el plásmido de ADN y una transposasa. En el plásmido se incluye el gen del CAR flanqueado por las secuencias diana de la transposasa la cual injertará el gen en un punto al azar del genoma, tras ello, el gen de la transposasa se degradará, previniendo así su posible genotoxicidad.

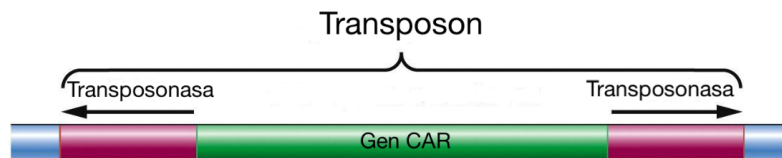


Figura 6. Gen CAR incluido en una secuencia transposon/transposonasa.

Adaptado de Griffiths, A 2008 (100)

Tras la electroporación, las células T se pueden expandir rápidamente mediante un sistema CAR dependiente y su co-cultivo sobre células presentadoras de antígeno artificiales gamma-irradiadas. De esta forma, se alcanzarían números de células transducidas terapéuticamente suficientes tras unas semanas después de la electrotransfección del transposón. Una de las mayores ventajas de estos sistemas es que permite la transducción de material genético mucho mayor que la de los retrovirus, donde la carga genética viene limitada por el tamaño reducido de la partícula viral. Además, cabe destacar su menor coste de producción aunque aún se requieren ensayos mucho más exhaustivos para validar su seguridad terapéutica.

Alternativamente, se han propuesto estrategias que se basarían en la transfección de ARN mensajero transcrito *in vitro* funcionando como un sistema de expresión temporal, lo cual podría generar grandes cantidades de células ya en fenotipo efector aunque este tipo son incapaces de proliferar en gran número y persistir *in vivo* por un largo tiempo que como veremos más adelante es uno de los requisitos imprescindibles del resto de estrategias. En cambio, la rápida inducción de estos CARTs seguida de su actividad y pronta senescencia podría complementarse con la administración repetida y seguida de nuevas dosis de células transfectadas con el sistema RNA, comportándose como un sistema tradicional de dosificación de carga y mantenimiento (54) (55). Éste sería además un sistema aconsejable donde la perduración de los CARTs *in vivo* no fuera deseable ya que el ARNm en el interior de la célula se degrada en su totalidad con la maquinaria propia de la célula sin necesidad de ningún fármaco activador ni ningún mecanismo de inducción externo.

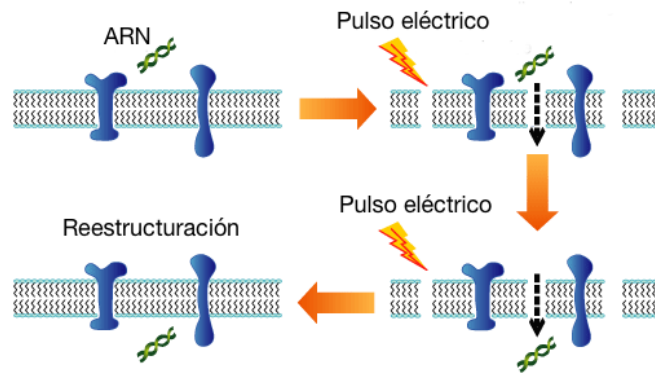


Figura 7. Esquema del mecanismo de electroporación.

Adaptado de Wallace, M 2009 (101)

## 2.5 Células efectoras

Desde un punto de vista teórico, ser capaz de seleccionar la célula huésped para ser transducida con el CAR tendría sin duda un impacto en la eficiencia del CART final. No obstante, desde un punto de vista práctico, la mejora real parece que no compensaría la dificultad de realizar dicha selección. Es por esto que, hasta la fecha, muchos investigadores optan con más frecuencia por utilizar la población de células T totales que son capaces de obtener del paciente por leucoaféresis. No obstante, algunos autores han insistido en la importancia de escoger la subpoblación celular más adecuada.

Los esfuerzos para caracterizar los efectos y la eficiencia antitumoral de cada subpoblación linfocitaria empezaron con la terapia de transferencia adoptiva de células T. A priori se pensaba que el uso de células T efectoras, es decir, ya activadas tras la presentación del antígeno cognato, proporcionaría linfocitos más específicos y eficientes en su actividad antitumoral. Así lo demostraban los ensayos *in vitro* donde los linfocitos activados efectores muestran claramente la mayor capacidad de eliminación de células tumorales. Además, ensayos preclínicos con ratones pudieron inducir a error en esta idea, pues, posteriormente se observó cómo los linfocitos T activados mostraban un grado de implantación *in vivo* en humanos mucho más pobre así como una proliferación limitada y mayor senescencia. Esto era debido en parte a los telómeros más acortados, mientras que en el modelo murino, la senescencia no se veía tan adelantada ya que sus linfocitos presentan telómeros mucho más largos (56) (57). Por el contrario, numerosas investigaciones posteriores han demostrado que las células T naïve (58), las T de memoria

centrales y las células madre T memoria (59) presentan una mejor implantación, longevidad y un potencial proliferativo mucho mayor. (60) (52)

Además, se sostenía el uso primordial de linfocitos T CD8+, los llamados citotóxicos, pues, como su nombre indica, son los que presentan la mayor capacidad citotóxica y que por lo tanto median directamente la muerte de las células tumorales. No obstante, algo que parece estar claro es que hasta que no entendamos bien estos mecanismos, cualquier abordaje reduccionista es una opción arriesgada y hasta ahora el uso de poblaciones totales de células T, incluyendo tanto CD4+ como CD8+, han demostrado ser la opción más segura (61). Esto se explicaría en parte, por la necesidad que tienen las células T CD8+ de cooperación por parte de los linfocitos T CD4+ para poder generar memoria inmunológica, lo cual parece ser indispensable para la eliminación total de la neoplasia y evitar la recidiva.

No obstante, cabe destacar que la selección de la subpoblación puede verse complicada por el estado del paciente oncológico, pues muchos habrán recibido previamente tratamientos quimioterapéuticos linfotóxicos, así como por la edad, pacientes de edades avanzadas presentan proporciones sustancialmente reducidas de linfocitos T naïve. Aun así, existen dos principales abordajes para poblaciones de linfocitos T en células con mayor potencial de enriquecimiento:

1. Realizando una separación inicial por citometría de flujo o por columnas magnéticas de las subpoblaciones específicas deseadas (en este caso los linfocitos T memoria tempranos) tras la obtención de los linfocitos del huésped. No obstante, esta técnica conlleva una alta manipulación del producto, lo cual es un factor a tener en cuenta puesto que para poder utilizar los CARTs como inmunoterapia, éstos deben desarrollarse bajo la estricta normativa de las condiciones GMP (del inglés Good Manufacturing Practices). Además, esta técnica también conlleva una inherente pérdida de células (62)
2. Mediante el cultivo de los linfocitos obtenidos del huésped y el uso de estrategias de cultivo para favorecer del crecimiento de una subpoblación específica. Esto se tratará con más detalle en el siguiente punto.

## 2.6 Preparación ex vivo

Existen resultados contradictorios en cuanto al uso de IL-2 en el precultivo de las células CART previa a la infusión en el paciente. IL-2 era la interleucina utilizada por excelencia en la transferencia adoptiva de linfocitos pues es un importante factor de activación de las mismas y se convirtió en un elemento central en una fase inicial cuando el objetivo a conseguir era la producción del mayor número de células in vitro posibles que poder infundir a posteriori. Para ello, el uso de altas concentraciones de IL-2 parecía la opción idónea. No obstante, el uso de esta interleucina, pese a conseguir una elevada proliferación celular, también conduce a una diferenciación terminal del fenotipo celular, generando así linfocitos con poca capacidad replicativa así como una senescencia celular más temprana con la consiguiente menor persistencia en el individuo reduciendo la

efectividad del tratamiento. No obstante, como avanzábamos en el punto anterior, existen diversas estrategias de cultivo para favorecer la proliferación de determinadas subpoblaciones linfocitarias; a continuación resumiremos las principales:

- La estimulación del co-receptor CD28 en linfocitos T CD4+ promueve el mantenimiento de un fenotipo de memoria central y la conservación de los telómeros (63).
- La estimulación de 4-1BB, induce crecimiento de las células de memoria central CD8+ (64)
- La estimulación con IL-7 e IL-15 resulta en un fenotipo de célula madre de memoria central, siendo células mucho más longevas.
- La activación del coestimulador inducible (ICOS) sostiene el crecimiento y estabilidad de las poblaciones Th17.
- En cultivo, se puede promover también la expansión de células madre de memoria inhibiendo la Kinasa glicógeno sintasa 3 beta (GSK3B) donde se induce la vía de señalización por Wnt (59) la cual representa una de las mejores poblaciones en cuanto a capacidad replicativa y persistencia (59).

Finalmente, una de las grandes limitaciones de la inmunoterapia con CARTs y uno de los campos donde más esfuerzos se están invirtiendo es el tiempo transcurrido desde que se caracteriza al paciente oncológico que será sometido a tratamiento con CARTs hasta que éstos están listos para ser inoculados. Un tiempo que se ha ido reduciendo notablemente gracias a la optimización de la metodología y los protocolos utilizados.

La elección de la célula huésped también es una variable optimizable y de gran importancia, en este aspecto se ha barajado la idea de preparar linfocitos huésped universales que estuviesen ya a punto "*off-the-shelf*" para ser usados sin tener que practicar una leucoaféresis del paciente. Para ello, el principal factor limitante es el posible rechazo del paciente hacia el injerto. Por ello, una de las ideas iniciales sería inhibir la expresión de HLA en la membrana de los linfocitos, así como cualquier otra proteína de membrana polimórfica susceptible de ser reconocida como ajena por el sistema inmunológico del receptor.

## 2.7 Acondicionamiento del huésped

La terapia de acondicionamiento linfoablativa se ha incluido en diferentes ensayos clínicos previa al tratamiento con CARTs con resultados que en la mayoría de los casos avalan su uso pese a los riesgos que conlleva. Mediante el uso de radiación gamma, ciclofosfamida así como el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab), se consigue la completa eliminación del compartimento linfocitario del paciente. Con esto se consigue un efecto potenciador de la implantación proliferación de las células CART como resultado de la homeóstasis del organismo. Además, en el caso del tratamiento de síndromes

linfoproliferativos B, se reducirá en gran medida la carga tumoral previa a la infusión del CART.

A parte de tener mayor capacidad de implantación y expansión en el paciente linfopénico, los CARTs también presentan una mayor capacidad de diferenciación que además puede potenciarse mediante la administración de citosinas, como IL-7 e IL-15 (65) (66) al paciente que favorecerán un destino fenotípico concreto de los CARTs infundidos.

En este campo, importantes ensayos se han llevado a término en el National Institutes of Health (NIH) de los EEUU, así como en la cuna de la inmunoterapia con CARTs, la Universidad de Pennsylvania (UPenn). En ellos, se utilizaron CARTs antiCD19 en ausencia de linfoablación previa consiguiendo respuestas clínicas modestas, mientras que cuando se usó linfoablación previa, se demostró tanto una mayor persistencia de los CARTs como un mayor grado de respuesta clínica cuanto más agresivo era el acondicionamiento previo por quimioterapia linfoablativa (67).

Pese a que estos estudios avalan el uso del preacondicionamiento del paciente para resultados óptimos, actualmente se buscan alternativas para inducir la mejor proliferación de los CARTs sin necesidad de quimioterapia para evitar los efectos indeseados inherentes a su uso, así como el riesgo que supone inducir una linfodepleción en el paciente (68).

## **2.8 Sistemas de seguridad: manteniendo los CARTs a raya en el delicado balance entre el bien y el mal**

La potente actividad citotóxica inmunodirigida de los CARTs, pese a ser el objeto deseado, es un arma de doble filo capaz de provocar toxicidad en los tejidos e incluso poner en riesgo la vida del paciente. Por este motivo, ser capaz de restringir, limitar, o incluso cesar cuando sea preciso, la actividad de los CARTs puede ser tan importante como potenciarla (69) (70) (71).

Los sistemas de suicidio celular inducibles (72) y la gestión de la toxicidad mediante el bloqueo de citocinas o los moduladores de señal de transducción se plantean como las nuevas fronteras en el campo de la inmunoterapia con CARTs.

### **2.8.1 Selección del antígeno diana**

Tal y como habíamos introducido, uno de los grandes retos a los que se expone la inmunoterapia con CARTs es la identificación del antígeno diana adecuado. (73)

El caso ideal sería la caracterización de un antígeno específico de tumor, no presente en ningún otro tejido pero igualmente vital para el tumor de forma que no pudiesen surgir cepas capaces de reprimir su expresión. Pero estos marcadores son extremadamente raros. Por el contrario es más común la presencia de marcadores en la superficie de las células tumorales comunes con otros tejidos que no son vitales o se encuentran a resguardo del sistema inmunitario, ya sea topológicamente, en los órganos inmunoprivilegiados o

cronológicamente (en el caso de proteínas de expresión en fases embrionarias). En casos más extremos, se pueden utilizar como diana antígenos sí presentes en tejidos extratumorales, pero a niveles considerablemente reducidos en comparación a los niveles de expresión en el tumor ya que estos tienen tendencia a sobreexpresar ciertos marcadores que les permiten acelerar su ciclo celular.

Sea como fuere, el carácter no exclusivo de la expresión de estos marcadores en el tumor conlleva la aparición de la toxicidad “*off-tumor on-target*” (71), con mayor o menor gravedad, y es por ello que la elección del antígeno diana es una variable de suma importancia a la hora de diseñar un tratamiento con la mínima toxicidad posible. A continuación describiremos algunos de los antígenos que se están fijando como objetivo de los tratamientos con CARTs que se están testando en la actualidad.

Por una parte podríamos considerar los antígenos de bajo riesgo como un grupo en sí, el uso de los cuales supondría efectos “*off-tumor on-target*” reducidos y perfectamente tratables. Con más de medio centenar de ensayos clínicos registrados usando antígenos que caerían en esta categoría, son la más común de las dianas tratadas. Aquí, incluiríamos los verdaderos antígenos específicos de tumor. Un ejemplo sería la variante 3 del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII), la cual es una versión incompleta del receptor, produciendo así señales de supervivencia tumorigénicas constantes. Esta versión alternativa del receptor es exclusiva de células tumorales y está ampliamente expresada en cáncer de próstata, ovario, cuello, glioblastoma multiforme y cáncer de pulmón de células no pequeñas (74).

Pero tal y como describíamos, estos antígenos específicos de tumor son raros, lo más común es apuntar contra los antígenos expresados tanto en el tumor como en tejido sano no vital. Y en esta categoría caería uno de los mayores éxitos de la inmunoterapia con CARTs, las neoplasias hematológicas y concretamente los síndromes linfoproliferativos B que trataremos más adelante. En estos casos, el uso de marcadores presentes tanto en las células tumorales B, como en los linfocitos B sanos, conlleva la pérdida total del compartimento celular B y por lo tanto la capacidad del huésped de montar nuevas respuestas inmunes adaptativas humorales. No obstante, este es un efecto secundario que se puede subsanar con la administración intravenosa periódica de inmunoglobulinas. Así, para estas enfermedades se pueden utilizar antígenos diana como los marcadores CD19, CD20 y CD22, todos ellos ampliamente expresados por linfomas no Hodgkianos, leucemia linfocítica crónica y leucemia linfoblástica aguda (75) (76) (77).

No obstante, y pese a los extraordinarios logros obtenidos en el tratamiento con CARTs de estas neoplasias, no se puede ignorar que debido a la persistencia de por vida de las células CARTs in vivo, a medida que más y más pacientes se sometieran a este tratamiento, la administración generalizada de terapia sustitutiva con inmunoglobulinas a partir de los bancos de donantes, podría acarrear una seria escasez en estos depósitos, por lo que se debe diseñar una alternativa a esta práctica.

El uso de CARTs “etiquetados” para su destrucción inducida, es una de estas estrategias, la cual trataremos en un apartado posterior. No obstante, en los últimos años

ha surgido una diana alternativa para estas neoplasias, capaz de mantener parte del compartimento linfocitario B intacto, que consiste en atacar la cadena ligera  $\kappa$  del receptor de antígeno de la célula B, de forma que todos los linfocitos B que en lugar de utilizar esta cadena, optaron por la cadena ligera  $\lambda$  quedarían resguardados de la citotoxicidad de los CARTs. Por ejemplo, el ensayo clínico NCT0081920 está evaluando el uso de esta diana. (79) (79)

Por otra parte, otra de las estrategias que pueden emplearse aprovecha el hecho de que los tejidos tumorales presentan una elevada desorganización respecto a sus tejidos progenitores. Así pues, la elevada compartimentalización y polarización de las membranas plasmáticas de los epitelios, se ve completamente alterada en tumores de origen glandular o del epitelio intestinal siendo más permeable. Así pues, mientras que los CARTs administrados de forma intravenosa, no suelen tener acceso a los antígenos que se hallan en el dominio apical que dan a la luz de un órgano hueco, la desorganización plasmática del tumor puede hacer aparecer estos antígenos en la membrana basolateral, dejándolos expuestos a la acción de los CARTs, pero dejando exentos de ésta al resto del epitelio.

Ésta fue una estrategia que se evaluó con extrema cautela, pues la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de antígeno, mediante el uso de TCRs y no de CARs (80), sí que generó células capaces de reaccionar a antígenos exclusivos de un dominio concreto de los epitelios, y por lo tanto atacar las células sanas. Esto se debe, no a que los linfocitos tengan la capacidad de atravesar las uniones ocluyentes que separan el dominio apical del basolateral de los epitelios, sino a que el TCR de los linfocitos T CD8+ responde a antígeno presentado en el contexto del HLA-I, de forma que una célula puede procesar sus autoantígenos de un dominio concreto y presentarlos en complejo con la molécula del HLA clase I en el dominio contrario.

Entre estos antígenos, se incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), el antígeno de mucina 1 (MUC1), el receptor alfa de folato (FR $\alpha$ ) y el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), todos ellos con expresión diferencial entre ambos dominios de diferentes epitelios, y sobreexpresados en ciertas neoplasias. Por ejemplo, el CEA, se encuentra presente principalmente en la superficie apical de los epitelios del sistema digestivo, mientras que una gran mayoría de los cánceres de pulmón de células no pequeñas, mama, estómago, endometrio y ovario lo expresan. Una media docena de ensayos clínicos ya han evaluado o están en proceso de evaluación de este antígeno como diana. (74)

Por otra parte, el PSMA solo se encuentra expresado en la superficie apical de epitelios intestinales, próstata así como las células del túbulo proximal renal; pero se sobreexpresa notablemente en las células del cáncer de próstata sin presentar una polarización clara, así como en los neovasos de muchos tumores sólidos.

En el caso de los antígenos inmunoprivilegiados, ya sea por su expresión en órganos como los testículos, o los antígenos embrionarios que se vuelven a expresar como consecuencia de la reactivación de su transcripción en la célula maligna, éstos suelen

corresponderse a proteínas plasmáticas, no membranales, por lo que su uso como diana terapéutica se limitaría a la detección de estos en el contexto de la presentación antigénica por HLA clase-I. Entre este grupo de antígenos caben destacar las proteínas MAGE-A3 y NY-ESO-1, los cuales solo se encuentran presentes en ciertos tumores, y en testículos. (81) (82)

Aunque una de las ventajas de la inmunoterapia con CARTs descrita anteriormente es su función independiente de presentación antigénica por HLA, (7,9) (48) en este caso supondría una desventaja, por lo que ya se han elaborado CARs cuya porción scFv es capaz de reconocer un epítipo concreto del antígeno diana en conjugación con la molécula de HLA. No obstante, las moléculas de HLA presentan un elevado polimorfismo en la población; en efecto, el complejo HLA constituye la proteína más polimórfica del ser humano. Por lo que estos scFv anti-complejo HLA-Antígeno serían específicos de haplotipo, restringiendo su uso y quedando además supeditado a la capacidad del tumor de inhibir la expresión de HLA o de reducir la presentación antigénica tal y como se había mencionado en un principio. Además, se ha observado que estos receptores quiméricos son capaces de reconocer, aunque con menor avidéz, otros polipéptidos ligeramente distintos presentados por HLA, lo cual puede llevar a una toxicidad en este caso “*off-target off-tumor*”, disparando las alarmas ante la posibilidad de respuestas autoinmunitarias que pueden llegar a ser fatales.

Hasta la fecha, el uso de CARTs en ensayos clínicos en la mayoría de los casos se ha limitado a la aplicación de esta terapia cuando todas las líneas de tratamiento ya habían fracasado, en pacientes con pronóstico de apenas unos meses de vida. En este contexto, puede ser asumible el riesgo de emplear antígenos sí presentes en tejidos vitales como diana del tratamiento. Obviamente, el traslado de estos tratamientos a la clínica requiere aún más meticulosidad y atención en el diseño experimental. Mientras que, como veremos con más detalle, los éxitos de la terapia en CART en hematologías B son asombrosamente esperanzadores, los resultados positivos en neoplasias T, mielomas y leucemias mieloides son limitados, o nulos, y en gran medida esto se deba a que los antígenos diana suelen presentarse en poblaciones celulares sanas cuya depleción resulta mucho más perjudicial de lo que es la eliminación de todo el compartimento B. Aun así, el pronóstico fatídico de muchos pacientes ha conducido a investigadores de múltiples grupos a optar por el “mal menor”.

La sorpresa ha venido cuando en ciertos casos no se ha producido la esperada toxicidad relacionada con la presencia del antígeno en tejidos sanos. Por ejemplo, en el ensayo clínico NCT01716364, donde se testaba el uso de un CART anti-antígeno de Lewis, presente en granulocitos activados para el tratamiento de leucemia mieloide aguda, se reportó una ausencia de toxicidad importante. El uso de la molécula de adhesión CD171, también ha dado resultados sin toxicidades preocupantes en el tratamiento de neuroblastoma, glioma y melanoma pese a su presencia fisiológica en el sistema nervioso central, medula adrenal y ganglios del sistema nervioso simpático.

En cambio, se ha hecho uso como diana del receptor tirosina quinasa 2 (ErbB2) en varios ensayos clínicos contra tumores cerebrales, entre otros tumores sólidos. En uno de



los casos, tuvo que detenerse el ensayo de forma precipitada debido a la muerte de uno de los pacientes por toxicidad a nivel cardiopulmonar, la cual se atribuye a la presencia, aunque a bajos niveles, de ErbB2 en el epitelio cardiopulmonar. Además, se expresa también en células epiteliales de los tractos gastrointestinal, respiratorio, reproductivo y urinario, así como derivados hematopoyéticos, piel, etc.

En el anexo 1 se listan los principales antígenos y las neoplasias en las que éstos se utilizan como diana, así como los tejidos sanos donde también están presentes y que por lo tanto son susceptibles a la acción citotóxica de los CARTs.

En este panorama que muestra una dificultad inherente a la elección del antígeno diana por la dificultad, casi imposibilidad, de encontrar un antígeno explotable que no se exprese en otros tejidos del huésped, surge un concepto interesante en cuanto a la interacción del antígeno y la molécula CAR, intrínseco a la dinámica cinética de complejos como el TCR, y es la afinidad de unión. De esta forma, un CAR que mostrase una baja afinidad en la unión con su antígeno complementario, requeriría elevadas concentraciones del antígeno en la superficie de la célula diana para poder desencadenar la respuesta del linfocito, por lo que el uso de CARs de este tipo, algo que se puede caracterizar *in vitro*, permitiría atacar antígenos sobreexpresados en la superficie del tumor y que aunque se expresen en tejidos vitales lo hagan a una concentración muy inferior de forma que los CARTs no pudieran ejercer una toxicidad crítica sobre éstos.

## **2.8.2 Rutas alternativas de infusión**

En el apartado anterior hemos mencionado cómo el uso de ErbB2 como antígeno diana condujo a la muerte de uno de los pacientes sobre el que se testó el CART debido a efectos drásticos en el epitelio cardiopulmonar del sujeto. De hecho, se han observado en diversos ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos, la concentración de toxicidad a nivel pulmonar y hepático. Diversos autores sugieren que estos efectos se deberían a los patrones de distribución post-inyección de los CARTs, que según Parente-Pereira et al en 2011 (83), tienden a acumularse en los pulmones tan solo media hora tras la inyección intravenosa, reduciéndose sus niveles en sangre drásticamente, y poco después aparecen también en hígado y bazo.

Este característico patrón de distribución ha llevado a tantear la posibilidad de utilizar otras vías de inoculación de los CARTs, centrándose especialmente en la inyección *in situ* para el tratamiento de tumores sólidos. Así, por ejemplo, se ha testado la administración intracraneal de los CARTs para el tratamiento del glioma, inyección intratumoral en cánceres de mama, cuello y cabeza, intrapleural para el tratamiento de mesotelioma pleural maligno.

En todos los casos se ha reportado en mayor o menor medida una acumulación de CARTs en el tumor favoreciendo la reducción en el número de células a inyectar necesarias para inducir respuesta clínica, lo cual restringiría la llegada de CARTs a tejidos secundarios sanos sensibles a su acción, reduciendo así la toxicidad del tratamiento.

### 2.8.3 Limitación de la persistencia in vivo y la actividad de los CARTs

Como se había mencionado anteriormente en cuanto a la elección del vector para la transducción de los linfocitos T, existe la posibilidad de utilizar vectores de ARN, mucho más fáciles de manejar que los vectores virales, y con una buena capacidad de transducción, los cuales inducirían la expresión del CAR de forma temporal. En este sentido ya se están probando diferentes CARs con esta estrategia, hasta la fecha CARs anti-mesotelina para mesoteliomas pleurales malignos y cáncer pancreático (84), o un CAR anti-CD19 para el tratamiento del linfoma de Hodgkin.

Pero también se puede limitar la actividad potencial del CART, dando un paso atrás y volviendo a las construcciones quiméricas de primera generación, en las que, como se describía anteriormente, la molécula CAR solo incluiría el dominio de señalización ITAM de la molécula CD3 $\zeta$  sin incorporar ningún módulo de coestimulación, lo que permitiría una activación y acción fugaz del linfocito, sin promover su expansión y persistencia. Ésta puede ser una estrategia a perseguir en casos donde el antígeno diana se presenta en tejidos vitales cuyo ataque puede resultar fatal, de forma que la acción del CART se limitaría a una función de contención y difícilmente se perseguiría la curación solo con este tratamiento.

### 2.8.4 Sistemas de eliminación “on-demand”: iCasp9 vs tagged CARTs

La incorporación de sistemas de suicidio inducibles dentro de la célula T modificada se antoja como uno de los mecanismos más atractivos mediante el cual se incluye un gen en el CART codificante para una proteína proapoptótica cuya actividad vendría determinada de forma exógena. Ya sea por la inclusión de un promotor inducible en el gen, de forma que solo se expresaría la proteína inductora de suicidio mediante la administración del compuesto que promovería la expresión del gen (85) (72). O por el contrario, un caso similar sería el del sistema iCasp9, donde se induce la expresión en los CARTs de una forma modificada de la Caspasa9 al fusionarse con una proteína denominada FK506. La caspasa9 es una proteína dimerica proapoptótica que desencadenaría la cascada de apoptosis, que solo sucede mediante la administración del fármaco FK506 que haría de puente entre las Caspasas9 lo cual activaría la cascada de apoptosis.

Otra opción es el uso de la timidina quinasa del herpes simple (HSV-tk), las células que la expresan son más sensibles al fármaco Ganciclovir que produce un metabolito tóxico que al introducirse en el ADN de una célula replicativa la inhibe y provoca su apoptosis.

Entre estas dos opciones, pese a que ambas se encuentra sometidas a estudio, el sistema de la iCasp9 presenta ciertas ventajas sobre el uso de HSV-tk. Mientras que el segundo necesita que la célula se encuentre en estado de replicación activa acabar activando la vía apoptótica, iCasp9 se puede inducir con mucha más celeridad y en cualquier estado del ciclo celular. Además, puesto que el sistema HSV-tk utiliza proteínas de origen no humano, éstas pueden ser detectadas fácilmente por el sistema inmunitario del huésped, reconocidas como extrañas y atacadas.

Alternativamente, una atractiva propuesta que ha surgido en los últimos años es el uso de la terapia con anticuerpos monoclonales, descrita en la segunda parte del apartado 2.1.1., para la eliminación de los CARTs mediante la inducción de citotoxicidad celular o del complemento mediada por anticuerpo. De esta forma se han trazado dos estrategias: en una de ellas se “etiquetaría” el CART (tagged CART) (86) (87) mediante la incorporación de un marcador de membrana contra el cual se dirigiría el anticuerpo monoclonal. En este sentido ya se han generado y testado diferentes construcciones CARTs: CAR anti-CD19, incorporando la molécula CD20 en su superficie (88), la cual sería diana del fármaco biológico Rituximab, o también incorporando una versión truncada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que sería reconocida por el biológico Cetuximab. En este caso, el CART anti-CD19 se inocularía en el huésped y una vez se considerase que ha finalizado su función, la administración del fármaco biológico correspondiente produciría la eliminación de los CARTs del organismo por acción del sistema del complemento, células citotóxicas y fagocitos.

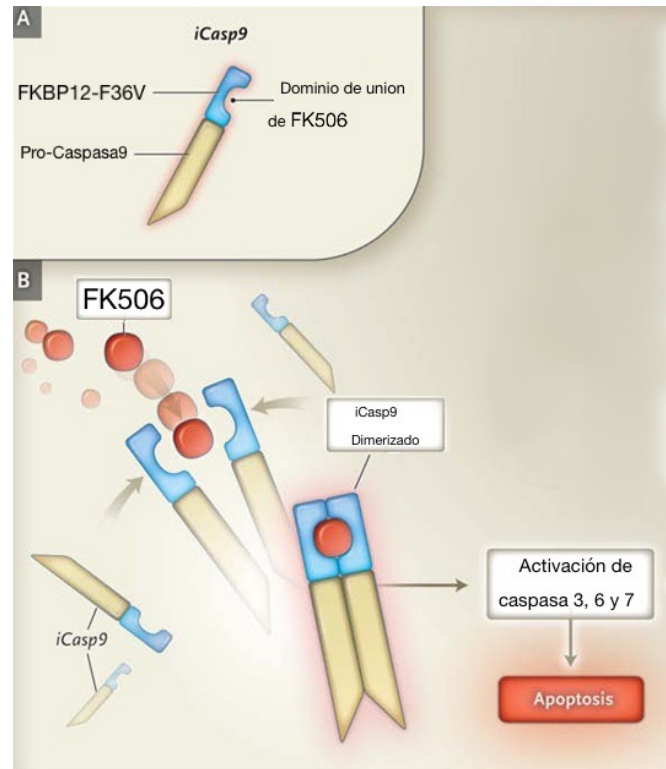


Figura 8. a. Molécula precursora de Caspasa9. b. Ruta de activación de apoptosis

Adaptado de Di Stasi, A 2011 (102)

Otra opción ideada es el uso de anticuerpos monoclonales anti-idiotipo. En este caso, el anticuerpo monoclonal administrado (el fármaco biológico) marcaría al CART para su eliminación mediante el reconocimiento de la zona variable de reconocimiento de antígeno (porción scFv) del receptor quimérico. De esta forma no haría falta incluir ningún marcador en el linfocito más que la propia molécula CAR.

### 2.8.5 Regulación de la activación: Split CAR vs iCAR

Los sistemas descritos se han trazado con el objetivo de destruir los CARTs una vez hayan completado su acción, no obstante, esto comporta la pérdida irreversible del que ha sido un producto difícil de elaborar a la par que altamente costoso. Teniendo en cuenta que uno puede esperar casos de recidiva tras la aparente remisión completa de la neoplasia, una estrategia a considerar para no ejercer el control de los CARTs mediante la eliminación del producto sería la regulación de la activación de los mismos. De esta forma, la célula solo sería operativa “on-demand”. Por ejemplo, uno de los diseños más recientes es el del “Split CAR” (*CAR partido*), donde el receptor quimérico estaría dividido en 2 moléculas separadas: una que incluiría la zona de reconocimiento antigénico, y la otra con

los dominios de señalización intracelulares, de forma que la acción citotóxica solo se induciría con la función sinérgica de ambas para lo cual sería necesario la asociación dimérica de éstas. Para ello, ambas moléculas van dotadas de porciones adaptadoras que se acomodarían a un factor heterodimerizante que en este caso sería un fármaco que se administraría en el momento que se deseara activar la función de reconocimiento y citotoxicidad del CART, a modo de botón de encendido. Esta estrategia está aún en fase de experimentación, tras la cual el siguiente paso sería comprobar si el factor de activación podría administrarse de forma local, limitando su acción a la zona del tumor sólido, evitando así la toxicidad *on-target off-tumor* de los CARTs, una hipótesis realmente atractiva y que podría eliminar una de las grandes barreras que hemos cubierto en detalle anteriormente de esta inmunoterapia que es la identificación y elección del antígeno diana, abriendo las barreras a la inclusión de muchísimas más dianas que hasta ahora quedan fuera de los límites terapéuticos.

En un abordaje muy similar encontramos los CAR inducibles (iCAR) en los cuales es la expresión en membrana de la molécula CAR la que está supeditada a ser inducida de forma exógena. Uno de los modelos incluye el gen del CAR precedido por un promotor de transcripción dependiente de tetraciclina, de forma que la expresión, incluso el grado e intensidad de ésta, se pueden regular mediante la administración a diferentes dosis de análogos de las tetraciclinas.

## 2.9 CARTs en el tratamiento de neoplasias hematológicas

Los síndromes linfoproliferativos B constituyen un conjunto de neoplasias altamente heterogéneo, de difícil clasificación, entre las que se incluyen una vasta mayoría de los ya mencionados linfomas no hodgkins, las leucemias linfoblásticas agudas B y la linfocítica crónica B. Se estima que este grupo de enfermedades tienen una incidencia de 15 a 25 casos por cada 100.000 habitantes al año y comparten la característica de expresar de forma muy generalizada el marcador CD19, un marcador de linaje B pan-celular, que al parecer constituye un marcador bastante importante para la supervivencia celular y proliferación de las células malignas y que por lo tanto la represión de su expresión suele ser rara constituyendo una excelente diana para la inmunoterapia con CARTs, pues pese a estar también expresado de forma extendida a lo largo del linaje B, su eliminación puede ser médicamente controlada para que no resulte un peligro para la vida del paciente. (89) (90)

Y es en este campo donde la inmunoterapia con CARTs ha dado los resultados más espectaculares. A continuación trataremos cada una de estas tres neoplasias por separado y pasaremos a tratar otros cánceres hematológicos donde el progreso en inmunoterapia con CARTs parece ser mucho más complicado, con resultados mucho más modestos aunque no desesperanzadores.

### 2.9.1 Leucemia linfocítica crónica (LLC), Leucemia linfoblástica aguda (LLA) y Linfoma no Hodgkin (LNH)

Los primeros ensayos en LLA proporcionaron resultados alentadores, con respuestas clínicas incluso remisiones completas en pacientes que tras agotar todas las líneas de tratamiento ya se consideraban incurables (40). El aumento del número de pacientes en los ensayos clínicos no solo han permitido refinar aún más la capacidad de curación de esta inmunoterapia, sino que ha ido dando resultados cada vez más optimistas, con tasas de remisión completa que se sitúan en el 70 a 90%, incluyendo pacientes tanto pediátricos como adultos, incluso con distintos diseños del constructo CAR (39) (37). Pero éste no es el único dato esperanzador, resultados como 70% de supervivencia libre de enfermedad a los 6 meses, así como 80% de supervivencia total a los 6 meses (37). En todos los casos, una mayor duración de la remisión sin recidiva se correspondía con persistencia de los CARTs in vivo, con la construcción 4-1BB favoreciendo este fenómeno por encima de los constructos con el dominio de coestimulación de CD28, de forma que en todos los casos la recaída se explicaba por una desaparición de los CARTs del organismo del paciente, o por el fenómeno de escape antigénico, es decir, la aparición de clones de células malignas que dejan de expresar la proteína CD19. Además, parece existir un cierto beneficio de la realización de un trasplante de células madre posterior, añadiendo una variable a tener en cuenta en el diseño del protocolo terapéutico.

En cuanto a la LLC, (91) de los 3 primeros pacientes, refractarios y en estadio muy avanzado, que se trataron en el grupo de Carl June en la UPenn, todos mostraron respuesta clínica, y 2 de los 3 alcanzaron la remisión completa a largo plazo. (52) (60) Aunque no tan espectaculares como en el tratamiento de LLA, estudios posteriores han situado la tasa de respuesta clínica entre el 30 y el 60%, mostrando resultados positivos en paciente que habían recidivado tras someterse a trasplante alogénico de células madre. (92)

En LNH, se han llevado a cabo ensayos en pacientes refractarios/recidivantes de linfoma folicular así como de linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) y se han observado resultados en la misma línea que en pacientes de LLC. LDCGB es el linfoma más prevalente en la población, cuya primera línea de tratamiento incluye el fármaco biológico rituximab en combinación con la quimioterapia CHOP, con resultados fenomenales, mostrando remisiones completas sostenidas de hasta el 70%, incluso en casos avanzados.

No obstante, las perspectivas para aquellos pacientes que recidivan tras conseguir la remisión con la primera línea de tratamiento son realmente pesimistas, con una gran mayoría de los pacientes sucumbiendo a la enfermedad tras agotar las diferentes estrategias disponibles en el mercado. Así, cabe destacar el gran éxito de los resultados con CARTs al haberse llevado a cabo en pacientes que se encontraban en esta segunda situación mucho menos esperanzadora.

Tanto en ALL, CLL como NHL, los efectos adversos de esta terapia son recurrentes y se resumen en la tormenta citocínica (CRS), toxicidad neurológica y una obvia aplasia de células B y su consecuente agammaglobulinemia. Los pacientes de ALL parecen mostrar los

síntomas más graves, especialmente en cuanto a la CRS, cuya gravedad es muy variable, desde síntomas gripales, fiebre, mialgias, náusea y vómitos, hasta síntomas de mayor gravedad incluso fatales como hipotensión y fallo multiorgánico. No obstante, esta gravedad está estrechamente correlacionada con la carga tumoral y con el posterior éxito de la terapia, y sus efectos se pueden tratar bloqueando la acción de la IL-6, utilizando por ejemplo el anticuerpo monoclonal tocilizumab que bloquea el receptor de esta citocina.

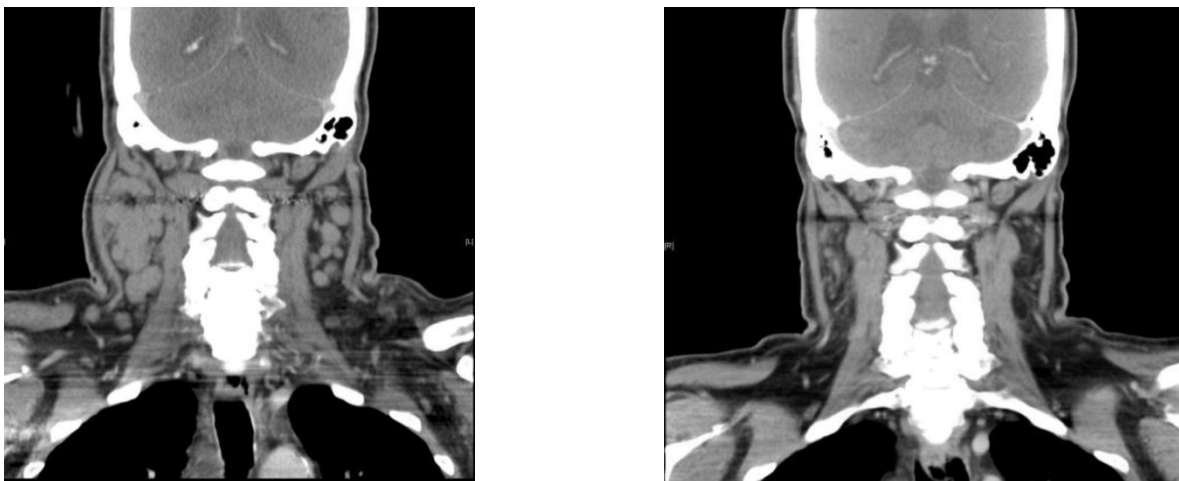


Figura 9. Paciente con LNH. a la izquierda TAC con tumoración en cuello previo al tratamiento. A la derecha TAC del mismo paciente tras tratamiento con CARTs Juno 2016 (105)

## 2.9.2 Leucemia mieloide aguda (LMA)

La leucemia mieloide aguda (LMA) constituye una neoplasia la cual ante una recidiva o en caso de enfermedad refractaria (el caso de los sujetos a los que se les puede incluir en ensayos clínicos de CARTs en la actualidad) presenta una muy mal pronóstico. El intento de incluir esta enfermedad hematológica entre las tratadas con CARTs está suponiendo un gran reto, pues los marcadores (potenciales antígenos diana) que expresa son comunes a una gran mayoría del resto de células del sistema hematopoyético cuya eliminación permanente conduciría a efectos letales, muchísimo más graves que la agammaglobulinemia experimentada al eliminar todas las células B CD19+ en el tratamiento de neoplasias como la LLA. Éste es el caso de CD123 y CD33, dos de los principales antígenos de membrana más ampliamente expresados entre las células neoplásicas de la mayoría de los afectados de LMA.

El uso de estos marcadores como antígenos diana se está estudiando con extrema cautela, pues el simple uso de inmunoterapia con anticuerpo monoclonal contra CD44v6, otro marcador asociado, aunque de forma no tan prevalente, a las células neoplásicas en LMA, condujo a la muerte de uno de los sujetos a consecuencia de toxicidad epitelial al encontrarse este marcador también en los queratinocitos de la piel.

Así, debido a la problemática que presenta esta neoplasia para su tratamiento con CARTs, la LMA se convierte en una candidata para el uso de las modificaciones de los CARTs descritas anteriormente, con el objetivo de activar de forma temporal la función de los

CARTs, ya sea mediante el uso de CARs inducibles, o el uso de sistemas de eliminación inducible de los CARTs por apoptosis, citotoxicidad mediada por anticuerpos, etc.



Figura 10. Paciente con LMA. a la izquierda PET-TAC de un paciente con LMA con metástasis múltiples. A la derecha PET-TAC del mismo paciente tras 28 días de tratamiento con CARTs anti-CD19 Juno 2016 (105)

### 2.9.3 Mieloma Múltiple

Solo en los Estados Unidos, 25000 personas son diagnosticadas con mielomas cada año. Su prevalencia y el hecho que aún hoy se considera una enfermedad incurable, menos de la mitad de los pacientes sobreviven 5 años tras el diagnóstico y todos recidivan, lo han colocado en el centro de miras para desarrollar una inmunoterapia con CARTs para su tratamiento. Los intentos de tratar esta enfermedad incluyen el trasplante de células madre alogénicas, fármacos inmunomoduladores como la talidomida, lenalidomida y la pomalidomida, así como los inhibidores del proteasoma, bortezomib y cafilzomib.

Pese a los éxitos conseguidos en las neoplasias de estirpe B descritas en el apartado anterior, el mieloma múltiple, un cáncer del estadio diferenciado de linfocito B es decir la célula plasmática, presenta grandes dificultades en el abordaje de su tratamiento con CARTs, pues no expresa el marcador CD19. No obstante, resultados moderadamente positivos en el uso experimental de anticuerpos monoclonales sugieren el éxito potencial de los CARTs.

Una de las herramientas principales en el abordaje de retos como el tratamiento del MM es el inmunofenotipado de la célula maligna para la identificación de marcadores de superficie útiles como diana de la inmunoterapia, algo que en el caso del MM empieza a dar sus frutos con la identificación de proteínas como CD38, CS1 y BCMA. (93) Su expresión en otros tejidos sanos impide que su uso esté exento de la toxicidad asociada ya descrita anteriormente. Así, es en el campo del tratamiento de MM donde se ha propuesto y empezado a testar para minimizar esto fue el uso de CARTs duales. Ésta es una estrategia fácilmente extensible a otras neoplasias y que consiste en la introducción de dos

receptores quiméricos en el mismo linfocito, generando CARTs capaces de reconocer 2 antígenos diferentes hallados en conjunción en las células neoplásicas, pero solo por separado en tejidos sanos. En un CART común, el encuentro de uno de los dos antígenos sería suficiente para la inducción de citotoxicidad por parte del linfocito, pero se podría modular la avidéz de los CARs, reduciéndola de forma que solo el reconocimiento conjunto de ambos antígenos a la vez fuese capaz de promover una respuesta por parte de la célula. No obstante, aún no se tiene un completo entendimiento de los mecanismos que controlan la respuesta de la célula CART, lo cual limita nuestra capacidad para utilizar con seguridad estrategias como ésta a nuestro favor. Alternativamente, en el uso de CARTs duales, también se ha contemplado la opción de utilizar un abordaje derivado de los Split CARs descritos en el apartado 2.8.5.

## 2.10 CARs en el tratamiento de tumores sólidos

Pese a los éxitos iniciales conseguidos en el tratamiento de neoplasias hematológicas, el tratamiento con CARTs de tumores sólidos está demostrando ser un reto mayor. En éstos, nos enfrentamos no solo a la dificultad de identificar el antígeno diana adecuado sino que, con tal de llevar a cabo su función tumoral, la célula CART debe también de sobrepasar importantes barreras: debe ser capaz de acceder al estroma desmosómico que acuna el tumor y una vez allí enfrentarse al poder inmunosupresor creado tanto por las células tumorales como del estroma que las da soporte.

La biología sintética, una vez más, se convierte en un gran aliado para socavar estas barreras y proporcionar tácticas terapéuticas.

Para empezar, el acceso al tumor vendría asociado a un fenómeno de extravasación y aposentamiento linfocitario dirigidos conocido con la voz anglosajona “homing” (94). Ciertos estudios sugieren que los vasos sanguíneos asociados a tumores se muestran anérgicos ante los estímulos inflamatorios, con lo que el endotelio no es capaz de presentar un estado “activado”, caracterizado por la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas que permiten el anclaje de leucocitos y su extravasación al tejido, en este caso, tumoral. (95) Esto impide la llegada normal de células del sistema inmunitario así como de las células CARTs que podrían combatir el tumor. En este sentido, se han realizado observaciones, sorprendentes pues parecen contradictorias, de que la administración de agentes anti-angiogénicos promueve una vuelta a la normalidad del endotelio de estos vasos, reclutando un mayor número de pericitos, y retomando la sensibilidad inflamatoria del endotelio, lo cual facilitaría la llegada al tumor de los CARTs.

Una vez dentro del estroma tumoral, para contrarrestar los efectos inmunosupresores del microambiente, los CARTs pueden ser diseñados para ser insensibles a TFG- $\beta$ , las IL-10 y 4, y también se pueden acompañar de co-tratamientos con los anticuerpos bloqueantes de CTLA4 y PD-L1 mencionados anteriormente, o con agentes bloqueantes del recientemente descrito, SHP-1. SHP-1 es una proteína inhibidora tirosin-fosfatasa ampliamente expresada



que en linfocitos T se ha descrito como una reguladora negativa de la activación dependiente de antígeno y la proliferación (96).

No solo esto sino que también podemos generar CARTs capaces de revertir este ambiente tumoral, en lo que se han llamado los “armored CARs” (CARs blindados, un juego de palabras en inglés) (97). Estos CARs blindados van equipados con la expresión transgénica de IL-12. Esta citocina constituye un potente agente inflamatorio producido en condiciones fisiológicas por las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos tras ser activados por el reconocimiento de patógenos invasores. Su diana son los linfocitos T sobre los que ejerce una potente acción inductora de la citotoxicidad y favorece la rama de respuesta Th1. Así, se está testando la conjunción del gen de esta interleucina con la inducción del gen del CAR de forma que la liberación de esta citocina se viese condicionada por la activación del CAR al interactuar con el antígeno asociado al tumor, evitando un exceso de producción de IL-12 a nivel sistémico lo cual podría producir graves efectos adversos.

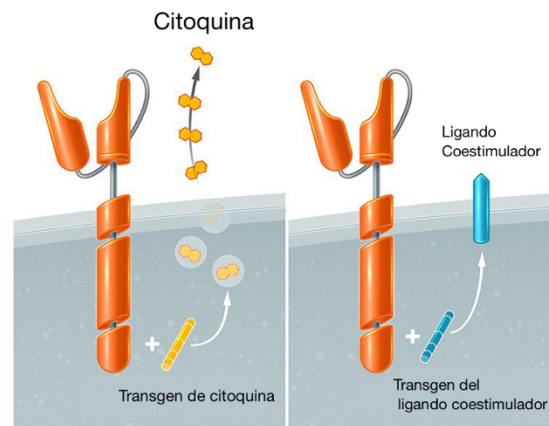


Figura 11. Armored CAR

Adaptado de Juno 2016 (105)

## D – Conclusión

Décadas de esfuerzos en la lucha contra el cáncer han dado sus frutos y a día de hoy somos capaces de curar con éxito multitud de neoplasias; pero este éxito parece estar íntimamente vinculado al tratamiento de la enfermedad tras el diagnóstico temprano. En cambio, el paciente diagnosticado con estadios avanzados de cáncer se enfrenta a una realidad más cruda, y es que la tasa de remisión completa para estos pacientes apenas ha mejorado en la última mitad de siglo.

Los CARTs son la prueba de que hemos recorrido un largo camino desde que Colley elaborase su primera vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria contra el tumor, y los pasos agigantados a los que avanza la biología sintética hacen casi inimaginable hasta dónde podremos llegar en los próximos años.

En el campo de la inmunoterapia se han desarrollado estrategias fascinantes para el tratamiento del cáncer, como los anticuerpos bloqueantes de “checkpoints”, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el cáncer o la transferencia adoptiva de células, cada una con sus virtudes y sus limitaciones. Los CARTs han aparecido como la promesa de combinar las virtudes de cada una de ellas para minimizar las limitaciones. En este aspecto, los CARTs constituyen linfocitos autólogos transducidos con una proteína quimérica en la que se combinan el dominio de reconocimiento extracelular procedente de la región variable de un anticuerpo específico de un antígeno diana concreto, con motivos

intracelulares de activación, supervivencia y expansión del linfocito. Así, se crea una arma inmunológica que combina la especificidad insuperable de los anticuerpos, con la efectiva acción citotóxica del linfocito T.

Pese a que, desde un punto de vista teórico, esta estrategia se antoja aparentemente perfecta solo limitada por la identificación del antígeno diana tumoral adecuado, los primeros ensayos clínicos empiezan a mostrar los aspectos que se deben mejorar; no obstante, resultados prometedores, especialmente en el tratamiento de enfermedades hematológicas, hacen sospechar que grandes éxitos podrían estar a la vuelta de la esquina.

## E – Anexo 1

Antígeno	Neoplasia	Dianas "off-tumor" potenciales
<i>BCMA</i>	MM	Células B
<i>CAIX</i>	RCC, tumores sólidos con hipoxia	Epitelio pancreatobiliar, mucosa gástrica, criptas del intestino delgado
<i>CD123</i>	AML	Progenitores mieloides, DCs, linfocitos B, mastocitos, monocitos, macrófagos, megacariocitos, células endoteliales
<i>CD138</i>	MM	Células plásmaticas y precursores B. Epitelios
<i>CD19</i>	ALL, CLL, NHL, HL, PLL	Linfocitos B normales
<i>CD20</i>	CLL, NHL	Linfocitos B normales
<i>CD22</i>	ALL, NHL	Linfocitos B normales
<i>CD30</i>	NHL, TCL, HL	Linfocitos T CD8 latentes, linfocitos B y Th2 activados
<i>CD33</i>	AML	Progenitores hematopoyéticos, precursores mielomonocíticos, monocitos
<i>CD38</i>	CLL, NHL, MM	PBMCs, médula ósea, cerebro, ojo, próstata, intestino, páncreas, músculo, hueso, riñón
<i>CD44v6</i>	Cáncer de cabeza y cuello, hígado, páncreas, estómago, pecho, colo; AML, NHL, MM	Queratinocitos de la piel, monocitos, linfocitos T activados
<i>CD44v7/8</i>	Cáncer de pecho y cervical	Epitelios normales
<i>CEA</i>	Cáncer de pecho, colorectal; tumores sólidos	Superficie epitelial apical de colon, estómago, esófago y lengua
<i>c-MET</i>	TNBC	hígado, tracto gastrointestinal, tiroides, riñones y cerebro
<i>CS1</i>	MM	PC, NK, NKTs, linfocitos T CD8+, monocitos activados y DCs
<i>CSPG4</i>	Melanoma, TNBC, GBM, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello, osteosarcoma	Células basales de la epidermis, células endoteliales, pericitos activados
<i>EGFR</i>	Tumores sólidos	Tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal
<i>EGFRvIII</i>	Cerebral/SNC, gliomas, GBM	Ninguno
<i>EphA2</i>	Glioma; cáncer de pecho, colo, ovarios, próstata y páncreas	Endotelios
<i>ErbB2</i>	Cáncer cerebral/SNC, gliomas, GBM, de cabeza y cuello, tumores sólidos	Epitelios gastrointestinal, respiratorio, reproductivo y del tracto urinario, piel, mamas, células hematopoyéticas

<i>FAP</i>	Mesotelioma	Fibroblastos en inflamación crónica, heridas y tejido en remodelación
<i>FR-α</i>	Cáncer de ovario	Superficie apical en epitelios de riñón, pulmón, tiroides, y mamas
<i>GD2</i>	NB, sarcomas, tumores sólidos	Piel, neuronas
<i>Igk</i>	CLL, NHL, MM	Linfocitos B normales
<i>IL-11Rα</i>	Cáncer de colon, estómago, pecho y próstata; osteosarcomas	Tejido estromal de tracto gastrointestinal, células endoteliales, epitelios glandulares y de superficie, hígado
<i>IL-13Rα2</i>	Cerebral/SNC, gliomas, GBM	astrocitos, cerebro, tejido de cabeza y cuello
<i>L1-CAM</i>	NB	SNC, ganglios SN simpático, médula adrenal
<i>Lewis<sup>y</sup></i>	AML, MM	Células progenitoras mieloides tempranas
<i>Mesotelina</i>	Mesotelioma; cáncer de páncreas y de ovario	Superficies mesoteliales peritoneal, pleural y pericardial
<i>MUC1</i>	Cáncer de colon, pulmón, pecho, ovarios, próstata, riñón, estómago, cabeza y cuello	Superficie apical de la mayoría de epitelios glandulares
<i>NKG2D-L</i>	AML, MM	Epitelio gastrointestinal, células endoteliales, fibroblastos
<i>PSCA</i>	Cáncer de próstata, vejiga y páncreas	Próstata
<i>PSMA</i>	Cáncer de próstata	Superficie apical de epitelios de próstata e intestinal, y células del tubulo proximal
<i>ROR1</i>	CLL, NHL	Pancreas, adipocitos
<i>VEGFR-2</i>	Tumores sólidos	Endotelio vascular y linfático

Abreviaturas: ALL, leucemia linfoblástica aguda; AML, leucemia mieloide aguda; BCMA, antígeno de maduración de célula B; CAIX, anhidrasa carbónica IX; CEA, antígeno carcinoembrionario; CLL, leucemia linfocítica crónica; SNC, sistema nervioso central; CSPG4, proteoglicano condroitin sulfato 4; DC, célula dendrítica; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGFRVIII, variante III del EGFR; EphA2, carcinoma hepatocelular productor de eritropoyetina A2; FAP, proteína de activación de fibroblastos; FR-α, receptor de folato α; GBM, glioblastoma multiforme; HL, linfoma de hodgkins; Ig, Inmunoglobulina; L1-CAM, molécula de adhesión celular L1; MM, mieloma múltiple; NB, neuroblastoma; NHL, linfoma no hodgkins; NK, natural killer; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; PC, célula plasmática; PLL, leucemia prolimfocítica; PSCA, antígeno de células madre de la próstata; RCC, carcinoma de célula renal; TCL, leucemia/linfoma de célula T; TNBC, cáncer de mama triple negativo; VEGFR-2, factor de crecimiento endotelial vascular-2.

**Tabla 2.** Tabla adaptada de Gross and Eshhar, 2016. (72)

## F – Bibliografía

1. Rosenberg S. Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. 2014; 21(2): p. 45-47.
2. Kiberstis P. Celebrating a Glass Half-Full. *Science*. 2006; 312(5777): p. 1157-1157.
3. Varmus H. The New Era in Cancer Research. *Science*. 2006; 312(5777): p. 1162-1165.
4. Edwards B, Noone A, Mariotto A, Simard E, Boscoe F, Henley S. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*. 2013; 120(9): p. 1290-1314.
5. Morgan G, Ward R, Barton M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clinical Oncology*. 2004; 16(8): p. 549-560.
6. Ashdown Coventry B. Complete clinical responses to cancer therapy caused by multiple divergent approaches: a repeating theme lost in translation. *Cancer Management and Research*. 2012;: p. 137.
7. Dahan Reiter Y. T-cell-receptor-like antibodies generation, function and applications. *Expert Rev Mol Med*. 2012; 14.
8. Couzin-Frankel J. Cancer Immunotherapy. *Science*. 2013; 342(6165): p. 1432-1433.
9. Coley W. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1893; 105(5): p. 487-510.
10. Diamond M, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn G, Archambault J. type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011; 208(10): p. 1989-2003.
11. Fuertes M, Kacha A, Kline J, Woo S, Kranz D, Murphy K. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8 + T cell responses through CD8 + dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011; 208(10): p. 2005-2016.
12. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(4): p. 265-277.
13. Anderson M, Shafer-Weaver K, Greenberg N, Hurwitz A. Tolerization of Tumor-Specific T Cells Despite Efficient Initial Priming in a Primary Murine Model of Prostate Cancer. *The Journal of Immunology*. 2007; 178(3): p. 1268-1276.
14. Ji H, Houghton A, Mariani T, Perera S, Kim C, Padera R. K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene*. 2005; 25(14): p. 2105-2112.
15. Russell J, Engiles J, Rothstein J. Proinflammatory Mediators and Genetic Background in Oncogene Mediated Tumor Progression. *The Journal of Immunology*. 2004; 172(7): p. 4059-4067.
16. Rock K, Hearn A, Chen C, Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immun*. 2004; 26(3): p. 231-246.
17. Navai S, Ahmed N. Targeting the tumour profile using broad spectrum chimaeric antigen receptor T-cells. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 391-396.

18. Kakarla S, Gottschalk S. CAR T Cells for Solid Tumors. *The Cancer Journal*. 2014; 20(2): p. 151-155.
19. Wang W, Ma Y, Li J, Shi H, Wang L, Guo F. Specificity redirection by CAR with human VEGFR-1 affinity endows T lymphocytes with tumor-killing ability and anti-angiogenic potency. *Gene Therapy*. 2013; 20(10): p. 970-978.
20. O'Connell J. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *Journal of Experimental Medicine*. 1996; 184(3): p. 1075-1082.
21. Singh S. Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1992; 175(1): p. 139-146.
22. Seung L, Rowley D, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995; 92(14): p. 6254-6258.
23. Unanue E, Allen P. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. 1987; 236(4801): p. 551-557.
24. Curiel T, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*. 2004; 10(9): p. 942-949.
25. Scott A, Wolchok J, Old L. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(4): p. 278-287.
26. Terabe M, Berzofsky J. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16(2): p. 157-162.
27. Ruella M, Kalos M. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunol Rev*. 2013; 257(1): p. 14-38.
28. Dudley M, Rosenberg S. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(9): p. 666-675.
29. Rayner A, Grimm E, Lotze M, Chu E, S. R. Lymphokine-activated killer (LAK) cells. Analysis of factors relevant to the immunotherapy of human cancer. *Cancer*. 1985; 55(6): p. 1333.
30. Mule J, Shu S, Schwarz S, Rosenberg S. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science*. 1984; 225(4669): p. 1487-1489.
31. Besser M, Shapira-Frommer R, Treves A, Zippel D, Itzhaki O, HersHKovitz L. Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients. *Clinical Cancer Research*. 2010; 16(9): p. 2646-2655.
32. Vonderheide R, June C. Engineering T cells for cancer: our synthetic future. *Immunol Rev*. 2013; 257(1): p. 7-13.
33. Barrett D, Singh N, Porter D, Grupp S, June C. Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer. *Annual Review of Medicine*. 2014; 65(1): p. 333-347.
34. Gill S, Porter D. CAR-modified anti-CD19 T cells for the treatment of B-cell

malignancies: rules of the road. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2013; 14(1): p. 37-49.

35. Carpenito C, Milone M, Hassan R, Simonet J, Lakhali M, Suhoski M. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(9): p. 3360-3365.
36. Milone M, Fish J, Carpenito C, Carroll R, Binder G, Teachey D. Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. *Mol Ther*. 2009; 17(8): p. 1453-1464.
37. Maude S, Frey N, Shaw P, Aplenc R, Barrett D, Bunin N. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371(16): p. 1507-1517.
38. Long A, Haso W, Shern J, Wanhainen K, Murgai M, Ingaramo M. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nature Medicine*. 2015; 21(6): p. 581-590.
39. Davila M, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine*. 2014; 6(224): p. 25.
40. Grupp S, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter D, Rheingold S. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013; 368(16): p. 1509-1518.
41. Chmielewski M, Hombach A, Abken H. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev*. 2013; 257(1): p. 83-90.
42. Boardman D, Maher J, Lechler R, Smyth L, Lombardi G. Antigen-specificity using chimeric antigen receptors: the future of regulatory T-cell therapy? *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 342-348.
43. Maus M, Grupp S, Porter D, June C. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 2014; 123(17): p. 2625-2635.
44. Porter D. Chimeric Antigen Receptor Therapy for B-cell Malignancies. *J Cancer*. 2011; 331.
45. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Schmollinger J, Endres S. A new PD1-CD28 chimeric receptor overcomes PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *European Journal of Cancer*. 2014; 50(S): p. 213.
46. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner M. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev*. 2013; 257(1): p. 107-126.
47. S. R. Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. 2014; 21(2): p. 45-47.
48. Paus R, Nickoloff B, Ito T. A «hairy» privilege. *Trends in Immunology*. 2005; 26(1): p. 32-40.

49. Willemsen R, Ronteltap C, Chames P, Debets R, Bolhuis R. T Cell Retargeting with MHC Class I-Restricted Antibodies: The CD28 Costimulatory Domain Enhances Antigen-Specific Cytotoxicity and Cytokine Production. *The Journal of Immunology*. 2005; 174(12): p. 7853-7858.
50. Amado R. Biomedicine: Lentiviral Vectors, the Promise of Gene Therapy Within Reach? *Science*. 1999; 285(5428): p. 6674-6676.
51. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang G, Soulier J, Lim A, Morillon E. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118(9): p. 3132-3142.
52. Scholler J, Brady T, Binder-Scholl G, Hwang W, Plesa G, Hege K. Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Science Translational Medicine*. 2012; 4(132): p. 53-132.
53. Kalos M, Levine B, Porter D, Katz S, Grupp S, Bagg A. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine*. 2011; 3(95): p. 73.
54. Muul L. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood*. 2002; 101(7): p. 2563-2569.
55. Barrett D, Zhao Y, Liu X, Jiang S, Carpenito C, Kalos M. Treatment of Advanced Leukemia in Mice with mRNA Engineered T Cells. *Human Gene Therapy*. 2011; 22(12): p. 1575-1586.
56. Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos C, Liu X, Brennan A. Multiple Injections of Electroporated Autologous T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor Mediate Regression of Human Disseminated Tumor. *Cancer Research*. 2010; 70(22): p. 9053-9061.
57. Mestas J, Hughes C. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*. 2004; 172(5): p. 2731-2738.
58. Straetemans T, Coccoris M, Berrevoets C, Treffers-Westerlaken E, Scholten C, Schipper D. T-Cell Receptor Gene Therapy in Human Melanoma-Bearing Immune-Deficient Mice: Human but not Mouse T Cells Recapitulate Outcome of Clinical Studies. *Human Gene Therapy*. 2012; 23(2): p. 187-201.
59. Hinrichs C, Borman Z, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(41): p. 17469-17474.
60. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos C, Quigley M. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*. 2011; 17(10): p. 1290-1297.
61. Porter D, Levine B, Kalos M, Bagg A, June C. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(8): p. 725-733.
62. Liadi I, Singh H, Romain G, Rey-Villamizar N, Merouane A, Adolacion J. Individual



- Motile CD4+ T Cells Can Participate in Efficient Multikilling through Conjugation to Multiple Tumor Cells. *Cancer Immunology Research*. 2015; 3(5): p. 473-482.
63. Maus M, Kovacs B, Kwok W, Nepom G, Schlienger K, Riley J. Extensive Replicative Capacity of Human Central Memory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2004; 182(11): p. 6675-6683.
  64. Kaneko S, Mastaglio S, Bondanza A, Ponzoni M, Sanvito F, Aldrighetti L. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood*. 2008; 113(5): p. 1006-1015.
  65. Maus M, Thomas A, Leonard D, Allman D, Addya K, Schlienger K. 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. *Nat Biotechnol*. 2002; 20(2): p. 143-148.
  66. Guimond M, Veenstra R, Grindler D, Zhang H, Cui Y, Murphy R. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature Immunology*. 2009; 10(2): p. 149-157.
  67. Klebanoff C, Khong H, Antony P, Palmer D, Restifo N. Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends in Immunology*. 2005; 26(2): p. 111-117.
  68. Dudley M, Yang J, Sherry R, Hughes M, Royal R, Kammula U. Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26(32): p. 5233-5239.
  69. Pegram H, Lee J, Hayman E, Imperato G, Tedder T, Sadelain M. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012; 119(18): p. 4133-4141.
  70. Colovos C, Villena-Vargas J, Adusumilli P. Safety and stability of retrovirally transduced chimeric antigen receptor T cells. *Immunotherapy*. 2012; 4(9): p. 899-902.
  71. Brentjens R, Riviere I, Park J, Davila M, Wang X, Stefanski J. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011; 118(18): p. 4817-4828.
  72. Gross G, Eshhar Z. Therapeutic Potential of T Cell Chimeric Antigen Receptors (CARs) in Cancer Treatment: Counteracting Off-Tumor Toxicities for Safe CAR T Cell Therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016; 56(1): p. 59-83.
  73. Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood*. 2014; 124(8): p. 1277-1287.
  74. Alonso-Camino V, Harwood S, Alvarez-Mendez A, Alvarez-Vallina L. Efficacy and toxicity management of CAR-T-cell immunotherapy: a matter of responsiveness control or tumour-specificity? *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 406-411.
  75. Kershaw M, Westwood J, Parker L, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis S. Phase I Study on

- Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(20): p. 6106-6115.
76. Kochenderfer J, Rosenberg S. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013; 10(5): p. 267-276.
  77. Till B, Jensen M, Wang J, Chen E, Wood B, Greisman H. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*. 2008; 112(6): p. 2261-2271.
  78. Till B, Jensen M, Wang J, Qian X, Gopal A, Maloney D. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*. 2012; 119(17): p. 3940-3950.
  79. Vera J SBVSBEPMRCEa. T lymphocytes redirected against the  $\lambda$  light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood*. 2006; 108(12): p. 3890-3897.
  80. Ramos C, Savoldo B, Liu E, Gee A, Mei Z, Grilley B. Clinical Responses in Patients Infused with T Lymphocytes Redirected to Target Kappa-Light Immunoglobulin Chain. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014; 20(2): p. 26.
  81. Circosta P, Granziero L, Follenzi A, Vigna E, Stella S, Vallario Aea. T Cell Receptor (TCR) Gene Transfer with Lentiviral Vectors Allows Efficient Redirection of Tumor Specificity in Naive and Memory T Cells Without Prior Stimulation of Endogenous TCR. *Human Gene Therapy*. 2009; 20(12): p. 1576-1588.
  82. Mannweiler S, Amersdorfer P, Trajanoski S, Terrett J, King D, Mehes G. Heterogeneity of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in Prostate Carcinoma with Distant Metastasis. *Pathology & Oncology Research*. 2008; 15(2): p. 167-172.
  83. Parkhurst M, Yang J, Langan R, Dudley M, Nathan D, Feldman S. T Cells Targeting Carcinoembryonic Antigen Can Mediate Regression of Metastatic Colorectal Cancer but Induce Severe Transient Colitis. *Mol Ther*. 2010; 19(3): p. 620-262.
  84. Parente-Pereira A, Burnet J, Ellison D, Foster J, Davies D, van der Stegen S. Trafficking of CAR-Engineered Human T Cells Following Regional or Systemic Adoptive Transfer in SCID Beige Mice. *Journal of Clinical Immunology*. 2011; 31(4): p. 710-718.
  85. Beatty G, Haas A, Maus M, Torigian D, Soulen M, Plesa G. Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T Cells Induce Antitumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunology Research*. 2013; 2(2): p. 112-120.
  86. Straathof K. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005; 105(11): p. 4247-4254.
  87. Jena B, Maiti S, Huls H, Singh H, Lee D, Champlin R. Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T Cells in Clinical Trials. *PLoS ONE*. 2013; 8(3).
  88. Wang X, Chang W, Wong C, Colcher D, Sherman M, Ostberg J. transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 2011; 118(5): p. 1255-1263.
  89. Griffioen M, van Egmond E, Kester M, Willemze R, Falkenburg J, Heemskerk M.

- Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy. *Haematologica*. 2009; 94(9): p. 1316-1320.
90. Maude S, Barrett D. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *British Journal of Haematology*. 2015; 172(2): p. 11-22.
  91. Gill S, June C. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev*. 2014; 263(1): p. 68-89.
  92. Kalos M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells in CLL: the next chapter unfolds. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2016; 4(1).
  93. Park J, Brentjens R. Immunotherapies in CLL. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;; p. 241-257.
  94. Martinez-Cingolani C, Bories J. Development of chimeric antigen receptors for multiple myeloma. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 397-405.
  95. Ager A, Watson H, Wehenkel S, Mohammed R. Homing to solid cancers: a vascular checkpoint in adoptive cell therapy using CAR T-cells. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 377-385.
  96. Whilding L, Vallath S, Maher J. The integrin  $\alpha\beta 6$ : a novel target for CAR T-cell immunotherapy? *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 349-355.
  97. Watson H, Wehenkel S, Matthews J, Ager A. SHP-1: the next checkpoint target for cancer immunotherapy? *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 356-362.
  98. Yeku O, Brentjens R. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochemical Society Transactions*. 2016; 44(2): p. 412-418.
  99. Vera J, Savoldo B, Vigouroux S, Biagi E, Pule MRC. T lymphocytes redirected against the  $\kappa$  light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood*. 2006; 108(12): p. 3890-3897.
  100. Griffiths A. Griffiths A. *Introduction to genetic analysis* New York: W.H. Freeman and Co.; 2008.
  101. Wallace M, Evans B, Woods S, Mogg R, Zhang L, Finnefrock A. Tolerability of Two Sequential Electroporation Treatments Using MedPulser DNA Delivery System (DDS) in Healthy Adults. *Mol Ther*. 2009; 17(5): p. 922-928.
  102. Di Stasi A, Tey S, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *N Engl J Med*. 2011 Noviembre;(365): p. 1673-1683.
  103. HaemaLogiX Pty. Ltd. haemalogix. [Online].; 2016 [cited 2016 Mayo 30. Available from: <http://www.haemalogix.com/science/overview/3>.
  104. Gilham D, Debets R, Pule M, Hawkings R, Abkan H. CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe. *Trends Mol. Med*. 2012 Julio; 18(7): p. 377-384.
  105. Therapeutics J. Juno Therapeutics. [Online].; 2015 [cited 2016 Mayo 30. Available from: <https://www.junotherapeutics.com>.