



# PRESENTE Y FUTURO DE LA INMUNOTERAPIA EN CÁNCER



**Trabajo Fin de Grado. Carolina González Falcón.**

**Grado en Farmacia.**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.**

**Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Título del trabajo: “PRESENTE Y FUTURO DE LA INMUNOTERAPIA EN  
CÁNCER”**

**Autor/a:** Carolina González Falcón.

**Lugar y fecha de presentación:** Facultad de Farmacia. 20-22 Septiembre 2017.

**Departamento:** Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia.

**Tutor/a:** Jose Luis Venero Recio.

**Tipología del proyecto:** Trabajo Fin de Grado de carácter bibliográfico.



## RESUMEN

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo. La falta de tratamientos en la actualidad, se debe fundamentalmente al desconocimiento de los mecanismos biológicos que causan la aparición y progresión del mismo. El microambiente tumoral proporciona a las células cancerosas nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, citocinas y distintos mediadores químicos que favorecen la proliferación, supervivencia, invasión y metástasis. Recientes avances en investigación clínica, demuestran que la caracterización del microambiente tumoral en diversos pacientes revela distintos fenotipos inmunológicos relacionados con la presencia o ausencia de inflamación regulada por células T del sistema inmunológico. Dado que el sistema inmunitario parece ser una poderosa arma contra el cáncer, la perspectiva de inmunoterapias eficaces se está convirtiendo en una realidad clínica. En el presente trabajo, y mediante la búsqueda de información en libros y artículos científicos recientes, se desarrollarán las distintas inmunoterapias en constante investigación aplicadas en la actualidad a pacientes enfermos. Dichas observaciones son y serán en un futuro de gran utilidad para para crear nuevas y prometedoras expectativas en la curación del cáncer, más efectivas y menos invasivas para los pacientes.

## ÍNDICE

<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>Pág. 4</b>
1.1. Historia	Pág. 4
1.2. Sistema inmunológico	Pág. 5
1.3. Fisiopatología del cáncer	Pág. 7
1.4. Microambiente tumoral y células T	Pág. 8
<b>2. <u>OBJETIVOS</u></b>	<b>Pág. 10</b>
<b>3. <u>METODOLOGÍA</u></b>	<b>Pág. 11</b>
<b>4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	<b>Pág. 12</b>
4.1. Fenotipos inmunológicos	Pág. 12
4.2. Inmunoterapias	Pág. 15
4.2.1. Bloqueo del punto de control	Pág. 17
4.2.2. Estrategias terapéuticas a seguir en pacientes con tumores con fenotipo carente de infiltración de células T	Pág. 19
4.2.3. Antígenos quiméricos T CAR	Pág. 21
➤ Estructura básica	
➤ Generaciones de CARs	
➤ Injerto de CARs en células inmunes: métodos de transferencia de genes	
➤ Objetivos y potencial terapéutico de las células T CAR	
➤ Poblaciones expresadas	
➤ Seguridad de las células T CAR	
➤ Resumen de la experiencia clínica en pacientes con cáncer	
4.3. Futuro y perspectiva	Pág. 32
<b>5. <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>Pág. 34</b>
<b>6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>Pág. 35</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y excesivo de células que invaden y dañan tejidos y órganos, siendo la segunda causa de muerte en los países desarrollados, sólo precedido por los accidentes cardiovasculares (Muñoz, 2004). El aumento paralelo de la incidencia del cáncer con respecto a la esperanza de vida de la población explica el interés médico y social de esta enfermedad, ya que la edad es el principal factor de riesgo para desarrollar un cáncer.

La falta de tratamientos se debe fundamentalmente al desconocimiento de los mecanismos biológicos que causan la aparición y progresión del cáncer. Durante más de medio siglo, los oncólogos han evaluado la gravedad del cáncer midiendo el tamaño del tumor, la presencia de éstos en los ganglios linfáticos y su diseminación por el resto del organismo. Sin embargo, en la actualidad, diversos estudios ofrecen la posibilidad de evaluar dicha enfermedad mediante la existencia de células inmunes en el tumor o alrededor de éste. Las células cancerosas y las células no transformadas del huésped interactúan de manera constante entre sí en el microambiente tumoral, por tanto, la inmunología del cáncer se trata de un área interdisciplinaria donde el análisis integrado de los factores del huésped y los tumorales es esencial (Ogino et al., 2011).

### **1.1. Historia**

Dado que el sistema inmunitario parece ser una poderosa arma contra el cáncer, la perspectiva de inmunoterapias eficaces se está convirtiendo en una realidad clínica. Durante gran parte del siglo XX, la atención se centró en la “inmunovigilancia” del cáncer, dada la idea de que el sistema inmunológico presenta un papel homeostático en el control de la enfermedad. Con el paso de los años, el concepto se ha ido perfeccionando mediante la “inmunoedición”, la cual reconoce la relación entre el tumor y el huésped en todas las etapas de desarrollo del cáncer (Mellman et al., 2011).

Los cánceres detectados clínicamente evaden la respuesta inmune del organismo para crecer progresivamente (Fesnak et al., 2016). Esta evasión podría ser llevada a cabo mediante características celulares y moleculares del microambiente tumoral.

En 1981, William Coley, cirujano de Nueva York, inició inyecciones intratumorales de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* vivos o inactivados en un esfuerzo por reproducir las remisiones espontáneas de sarcomas. Este experimento demostró la capacidad del sistema inmunitario de causar inflamación y destruir bacterias invasoras, las cuales fueron llamadas “toxinas de Coley” (Mellman et al., 2011). El resultado demostró que las bacterias lograron estimular fagocitos antibacterianos que podrían eliminar las células tumorales de los pacientes, siendo éste el comienzo de la historia de la inmunoterapia en el cáncer. Sin embargo, los oncólogos continuaron dependiendo de la cirugía y, cada vez más, de métodos como la radioterapia y en última instancia de la quimioterapia.

### **1.2.Sistema inmunológico:**

El sistema inmunológico es crucial para la supervivencia humana. Si no realizara su labor en el organismo, incluso infecciones menores podrían tornarse incontrolables y resultar letales. La respuesta inmunitaria implica el reconocimiento del agente extraño seguido de su destrucción.

Las células del sistema inmunitario son generadas por el organismo en un proceso llamado hematopoyesis, siendo las más importantes los leucocitos y las células tisulares relacionadas con ellos. Todas provienen de una célula troncal común llamada célula troncal hematopoyética pluripotente, que también da origen a los eritrocitos y a los megacariocitos, precursores de las plaquetas (Parham, 2015). Todos estos tipos celulares se denominan en su conjunto células hematopoyéticas.

En cuanto al linaje linfocítico de los glóbulos blancos, se distinguen dos poblaciones: linfocitos grandes con citoplasma granular y linfocitos pequeños casi sin citoplasma. Los linfocitos grandes granulares son células efectoras de la inmunidad innata llamadas células asesinas naturales (células NK), las cuales ingresan en los tejidos infectados impidiendo la propagación de dicha infección destruyendo las células afectadas y segregando citocinas, proteínas de bajo peso molecular que actúan como mensajeros intercelulares que intervienen en la maduración y amplificación de la respuesta inmune (Hearps et al., 2017).

Los linfocitos pequeños son células responsables de la respuesta inmunitaria adaptativa. El reconocimiento de un antígeno por este tipo de linfocitos implica un proceso de selección, crecimiento y diferenciación linfocíticos que conduce a una potente respuesta inmunitaria (Parham, 2015). Los linfocitos pequeños abarcan distintos sublinajes que se distinguen por sus receptores de superficie celular y por las funciones que desempeñan, diferenciándose entre linfocitos T y linfocitos B. Para los primeros, los receptores se conocen como receptores de células T, mientras que, para los segundos, los receptores son las inmunoglobulinas de membrana o receptores de células B.

Ambos tipos de receptores reconocen a un antígeno correspondiente, el cual puede ser cualquier molécula, partícula de virus o célula que contenga una estructura reconocida. Las diferencias en las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las inmunoglobulinas y los receptores de células T crean una amplia variedad de sitios de unión que son específicos para diferentes antígenos. Una consecuencia de esta especificidad, es que la respuesta inmunitaria adaptativa que se presenta contra un antígeno en concreto, no proporciona inmunidad frente a otro. Por tanto, los anticuerpos elaborados en respuesta a una determinada patología se unirán expresamente a sus antígenos específicos y no a otros, siendo ésta una de las más importantes premisas en el desarrollo de la inmunoterapia frente al cáncer (Parham, 2015), especialmente la modificación genética de linfocitos T frente a un determinado tipo de tumor.

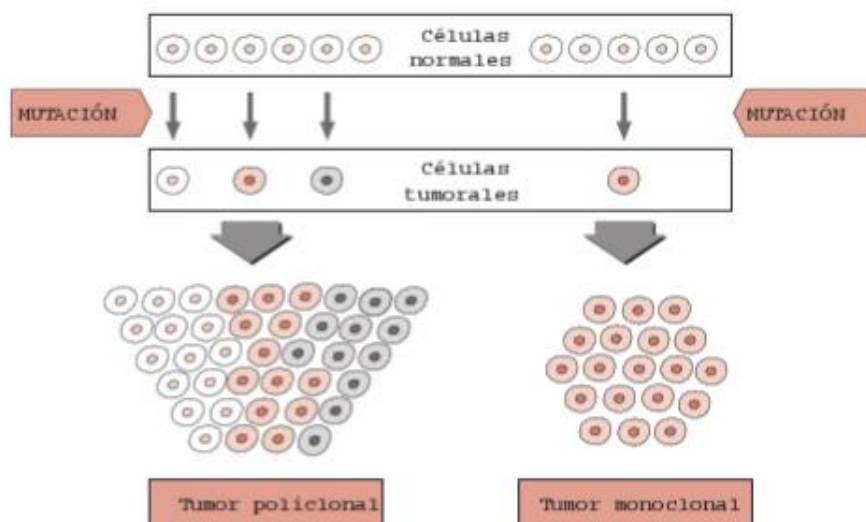
Las células T efectoras se subdividen en dos tipos principales, las llamadas células T citotóxicas y células T cooperadoras. Las primeras se encargan de destruir las células que contienen el antígeno y las segundas secretan citocinas. Una tercera subserie de células T cooperadoras son las células T reguladoras (células Treg), las cuales controlan las actividades de las células citotóxicas, lo que previene el daño tisular innecesario y detiene la respuesta inmunitaria una vez se ha erradicado el patógeno.

En el caso de la inmunoterapia relacionada con el cáncer, las células dendríticas cobran notable importancia (Sie y Korn, 2017). Residen en los tejidos corporales actuando como mensajeros celulares para desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa. Son las principales células presentadoras antigénicas, por su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T y generar respuestas inmunes específicas. También son capaces de activar los linfocitos B, células NK, macrófagos o eosinófilos e incluso generar tolerancia inmunológica, que conduce a la delección de células T, anergia o producción de células Treg (Li et al., 2015).

Todas estas actividades han dado lugar al desarrollo de ensayos clínicos basados en el uso de este tipo de células en el campo de la inmunoterapia antitumoral.

### 1.3. Fisiopatología del cáncer

El cáncer se origina a partir de una sola célula, es decir, todas las células que constituyen un tumor son monoclonales. La posibilidad alternativa de que los tumores provinieran de diversas células originales, y por lo tanto fueran policlonales, se ha descartado mediante análisis de marcadores genéticos en células tumorales (Muñoz, 2004). El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de alteraciones genéticas durante un periodo de tiempo determinado que les proporcionan ventaja en cuanto a crecimiento, siendo este más rápido (Figura 1). Esta característica las hace más competitivas frente a células normales circundantes y las lleva a proliferar sin restricciones para, posteriormente, adquirir capacidad invasiva y formar tumores secundarios o metástasis.



**Figura 1: Composición celular de los tumores según el modelo monoclonal y policlonal** (Muñoz, Alberto. Cáncer: genes y nuevas terapias. Madrid, ES: Hélice; 2004).

El cáncer es una enfermedad genética generalmente no hereditaria, el cual suele afectar a células somáticas pero no germinales, que es lo que explica que no se transmita a la descendencia (Cortinas, 2011). El hecho de que todas las células de un tumor provengan de una única célula que resulta alterada implica que esta anomalía de origen se transmite de la célula inicial a las células descendientes.



Existen dos posibilidades de herencia de dichas mutaciones: por un cambio genético en la secuencia de ADN celular, o bien por un cambio epigenético: es decir, por una alteración en el modo en que se expresan los genes. Aunque en principio es posible la aparición de tumores por cambios epigenéticos, la evidencia de que una célula cancerosa siempre da lugar a nuevas células cancerosas y nunca a células normales indica que la mayoría de los cánceres son consecuencia de cambios o mutaciones en el ADN de las células (Gu, 2014). Es importante entender que la transmisión de las alteraciones no implica que el desarrollo de un cáncer en un individuo sea heredado por su descendencia. Esto ocurre en un porcentaje de casos pequeño y depende del tipo de cáncer. Sólo cuando las mutaciones aparecen en las células germinales (espermatozoides u óvulos), se transmiten a la descendencia.

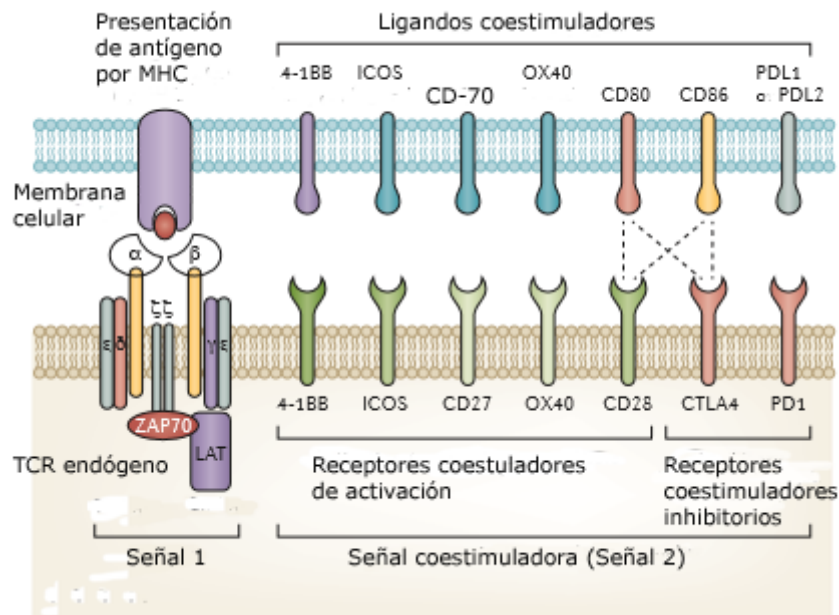
#### **1.4. Microambiente tumoral y células T**

El microambiente tumoral proporciona a las células cancerosas nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, citocinas y distintos mediadores químicos que favorecen la proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Ogino et al., 2011).

Las células tumorales se comportan como antígenos y, como tal, se producen respuestas inmunes contra dichos antígenos que pueden ser de baja labilidad, limitando de esta manera la respuesta terapéutica. Sin embargo, los neoantígenos generados por mutaciones en genes normales del organismo, pueden resultar en células T antitumorales bastante potentes. Algunos tipos de cáncer presentan cientos de mutaciones que representan una gran variedad de antígenos que sirven como objetivos potenciales para el reconocimiento por el sistema inmunológico.

Existen receptores de células T, llamados TCR, los cuales reconocen a un antígeno presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Figura 2). La señal de especificidad otorgada por TCR (señal 1) conduce a la función efectora, pero las células T también requieren una señal coestimuladora denominada señal 2, formada por dominios coestimuladores activadores e inhibidores (Mellman y cols., 2011).

Los receptores coestimuladores inhibidores pueden jugar un papel importante en el mecanismo de evasión de tumores. Los más importantes son el antígeno 4 citotóxico asociado a linfocitos (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada (PD1).



**Figura 2: Presentación de antígeno o célula tumoral a la célula T:** CD28 y CTLA-4 se unen a ligandos CD80 y CD86 determinando el curso de activación e inhibición de células T. En base a esto, muchos tumores regulan positivamente el ligando PD1 (PD-L1) entre otros ligandos para desactivar las células T, al mismo tiempo que también pueden regular negativamente el MHC para evadir la respuesta inmunológica. (Fesnak et al., 2016).

La unión del receptor de células T al péptido-MHC es un requisito previo para la función efectora de células T. Un mecanismo de escape del tumor bien documentado es la modulación o disminución de la regulación de MHC en la superficie de la célula tumoral, que hace que el tumor sea “invisible” a las células T y por tanto no haya activación de las mismas ni, por tanto, efecto antitumoral. (Lipowska-Bhalla et al., 2012).

## 2. OBJETIVOS

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, solo precedido de los accidentes cardiovasculares. La falta de conocimiento acerca de los mecanismos biológicos que lo desarrollan junto con la falta de evidencias clínicas, han sido unos de los motivos de mayor peso para el impulso a la investigación de nuevas terapias alternativas que logren una mayor efectividad y pronóstico de la enfermedad, destacando la inmunoterapia en el cáncer.

Por todo ello, los objetivos de la presente revisión han sido:

1. Conocer cronológicamente el desarrollo de la inmunoterapia en el cáncer, así como el estado actual en lo referente a nuevas terapias inmunitarias de las cuales se tienen evidencias científicas mediante ensayos murinos y clínicos a pacientes que padezcan cáncer.
2. Completar la revisión con un estudio de las perspectivas terapéuticas conociendo los puntos débiles de las terapias en actual investigación con el fin de promover una nueva generación de tratamientos efectivos y menos invasivos para el paciente.

### 3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de la revisión, se utilizaron diversas fuentes de información:

- Bases de datos. Entre ellas Pubmed y Medline. Estas fuentes han aportado información útil y fiable para el desarrollo del trabajo mediante el acceso a artículos, informes científicos y material de interés respecto al tema en estudio. Gracias a las referencias bibliográficas citadas en dichos artículos se ha podido obtener mayor información y acceder a otros artículos relacionados.
- Libros: Parham, Peter. Inmunología. 4ª ed. Distrito Federal, MÉXICO: El Manual Moderno; 2015 para obtener información acerca de las bases de la inmunología, Muñoz, Alberto. Cáncer: genes y nuevas terapias. Madrid, ES: Hélice; 2004 para conocer la biología en cáncer y Cortinas, Cristina. Cáncer: herencia y ambiente. México, D.F., MX: FCE - Fondo de Cultura Económica, 2011. Todos consultados a través de la plataforma FAMA de la Universidad de Sevilla, de los cuales se ha obtenido información básica, así como ampliación de los conocimientos aportados por los artículos científicos.
- Recursos electrónicos. Han facilitado el acceso a información necesaria para la elaboración de la presente revisión mediante el acuerdo de la Universidad de Sevilla con diferentes revistas electrónicas a través de la biblioteca online.

Todo ello se ha utilizado de manera conjunta con Mendeley, usado como base de datos para el almacén de los artículos consultados y como gestor bibliográfico a la hora de adjuntar referencias bibliográficas.

La búsqueda se ha realizado seleccionando artículos relevantes y actualizados sobre el tema de estudio. Se comenzó con una búsqueda general utilizando palabras claves tales como: Cáncer e Inmunoterapia, así como búsquedas en inglés con el término cáncer immunotherapy.

Por último, se concretó una búsqueda más específica sobre el sistema inmunológico, historia, fisiopatología del cáncer y tratamiento a través de las siguientes palabras clave, tanto en inglés como en castellano: Inmunología (immunology), células dendríticas (dendritic cells), tratamiento cáncer (cancer treatment), tumor, T-body, celular therapy, adaptive T cell therapy, etc.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1.Fenotipos inmunológicos:**

Recientes avances en investigación clínica, demuestran que la caracterización del microambiente tumoral en diversos pacientes revela distintos fenotipos inmunológicos relacionados con la presencia o ausencia de inflamación regulada por células T (Figura 3). Estas observaciones son y serán en un futuro de gran utilidad para generar distintos biomarcadores predictivos que permitan abarcar diversas intervenciones inmunoterapéuticas para crear nuevas y prometedoras expectativas en la curación del cáncer (Gajewski et al., 2013). Sin embargo, esta meta se ve obstaculizada por la complejidad del sistema inmunitario.

Según distintos estudios, los pacientes cuyo sistema inmunitario responde al tumor, tienen una mayor probabilidad de respuesta efectiva a terapias inmunitarias. No obstante, evaluar la respuesta inicial supone un reto, ya que está influenciada tanto por la genética del paciente, el entorno del mismo, así como la secreción de proteínas por parte del tumor, las cuales pueden inhibir las células inmunitarias del organismo (Ledford, 2013).

Gran parte de los esfuerzos dirigidos a la obtención de nuevas inmunoterapias radica en la activación de las respuestas inmunitarias antitumorales, estrategias llamadas “bloqueo del punto de control”. Se basan en el uso de anticuerpos que bloquean las vías inmunitarias inhibidas por las células tumorales actuando como frenos moleculares, evitando la hiperactividad de las células T y, en algunos casos previniendo la autoinmunidad (Wolchok y Chan, 2014).

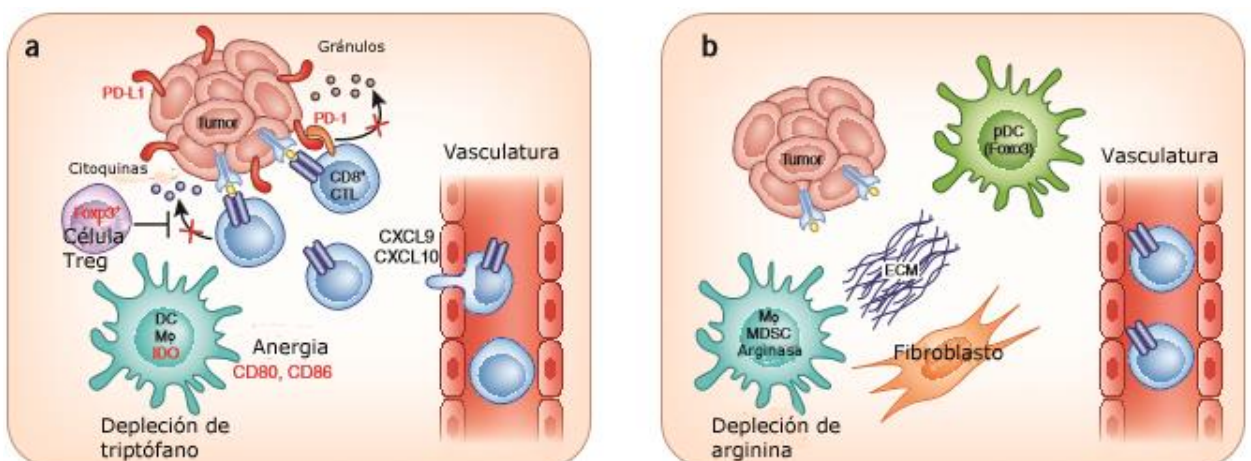
La identificación de vías inmunosupresoras definidas que están presentes en el microambiente tumoral en el subconjunto de tumores con infiltración de células T han apuntado hacia dianas terapéuticas que son susceptibles de intervención clínica, incluyendo el eje PD-L1-PD-1, IDO, células Treg y la anergia intrínseca de células T.

Los dos receptores de punto de control inmune estudiados más activamente en el contexto de la inmunoterapia en el cáncer son CTLA-4 (antígeno 4 citotóxico asociado a linfocitos T) y PD-1 (proteína de muerte celular programada). Ambos son receptores que cuando están unidos por sus ligandos, desencadenan vías inhibitorias que anulan la actividad de las células T (Kirkwood et al., 2012).

CTLA-4, se expresa exclusivamente en células T donde regula principalmente la amplitud de las primeras etapas de activación de dichas células. En contraste con CTLA-4, el papel principal de PD-1 es limitar tanto la actividad de las células T en los tejidos periféricos en respuesta a una infección como la autoinmunidad. Esto se traduce en un importante mecanismo de resistencia inmune dentro del microambiente tumoral. La expresión de PD-1 se induce cuando las células T se activan. Cuando se activa por uno de sus ligandos (PD-L1), inhibe las quinasas que están implicadas en la activación de las células T (Prat et al., 2017).

De forma similar a CTLA-4, PD-1 está altamente expresado en células Treg. Debido a que muchos tumores están altamente infiltrados con células Treg, que probablemente suprimen aún más las respuestas inmunitarias efectoras, el bloqueo de la vía PD1 también puede potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales al disminuir el número y/o actividad supresora de las células Treg intratumorales (Shih et al., 2014).

Otra categoría de moléculas inmunitarias inhibitoras incluye ciertas enzimas metabólicas como la indolamina-2,3-desoxigenasa (IDO), que se expresa tanto por las células tumorales como por las células mieloides infiltrantes, y la arginasa, producida por las células supresoras derivadas de mieloides. Estas enzimas inhiben las respuestas inmunes a través del agotamiento local de los aminoácidos que son esenciales para las funciones anabólicas de los linfocitos, particularmente las células T (Vignali y Kallikourdis, 2017).



**Figura 3: Modelo de vías reguladoras del sistema inmune en el microambiente tumoral. A: Fenotipo inmunológico de pacientes con tumores infiltrados por células T. B: Fenotipo inmunológico de pacientes con tumores no infiltrados por células T. (Gajewski et al., 2013).**

El fenotipo inmunológico al que pertenecen los pacientes con tumores infiltrados por células T (Figura 3a), consiste en la presencia de citoquinas, las cuales apoyan el flujo de células T CD8+. Sin embargo, posteriormente la funcionalidad de estas células T CD8+ se ve inhibida por las células PD-L1 (Programmed death ligand-1) del sistema inmunitario, IDO, y células T reguladoras (Treg) al mismo tiempo que se produce anergia intrínseca de las células T (Law et al., 2017). Este tipo de tumores parece resistir el ataque inmunológico mediante efectos inhibitorios dominantes de las vías de supresión del sistema inmune.

En el fenotipo inmunológico de tumores no infiltrados por células T (Figura 3b), la expresión de citoquinas es escasa y la presencia de vías inmunitarias inhibitorias es mínima, por lo que parece resistir el ataque inmunológico a través de la exclusión de sistema inmune.

Debida a la existencia de estos dos fenotipos inmunológicos, las estrategias de terapia inmunológicas deberán ser distintas. El propósito de la medicina personalizada es identificar el tratamiento óptimo para cada paciente con el fin de conseguir el máximo beneficio del tratamiento y minimizar los efectos adversos (Ogino et al., 2011).

En la actualidad, diversos estudios han revelado que los tumores infiltrados por células T pueden responder óptimamente a terapias dirigidas a mecanismos inhibidores del sistema inmunitario. Un subconjunto de pacientes con tumores sólidos tales como cáncer de mama, carcinoma de células renales, melanoma, cáncer de ovario y tumor gastrointestinal muestran este infiltrado de células T, por lo que pueden tener un valor pronóstico positivo (Sharma et al., 2017).

Por otro lado, los tumores no infiltrados por células T requerirán de terapias que previamente provoquen la inflamación óptima y la activación inmune innata del microambiente tumoral (Gajewski et al., 2013). En cualquier caso, la utilización de inmunoterapias combinadas ya está entrando en el campo clínico con resultados alentadores. En un modelo de cáncer de ovario, se aislaron células endoteliales vasculares de tumores infiltrados por células T frente a tumores no infiltrados y se realizaron perfiles de expresión génica para identificar fenotipos moleculares asociados con la exclusión de células T. Se identificó el receptor de endotelina B como un regulador prometedor, y la inhibición de éste podría mejorar el tráfico de células T.

Este aspecto está basado en la creencia hasta el momento del papel que juegan las células endoteliales vasculares en la migración de células T al microambiente tumoral y también a la producción de citocinas específicas, que también pueden contribuir al reclutamiento de células T (Nagarsheth et al., 2017)

Un aspecto importante es el reconocimiento del hecho por el que los fragmentos de tumores que contienen elementos estromales son bastante más difíciles de rechazar inmunológicamente. Este estroma tumoral sólido consiste en fibroblastos, macrófagos, células endoteliales vasculares y cantidades variables de matriz extracelular, lo que contribuye a formar una estructura de soporte para el crecimiento tumoral y alterar las respuestas inmunitarias del huésped modificando el grado de infiltración de células inmunes (Garg et al., 2017).

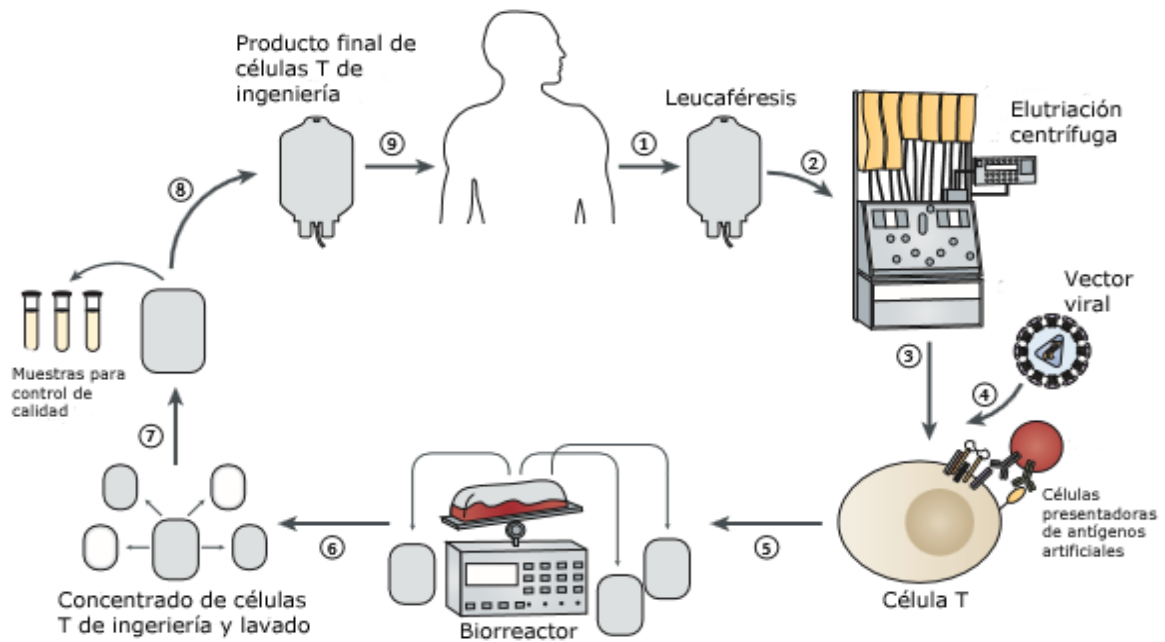
El estudio de anticuerpos monoclonales antagonistas de CD-40 (proteína coestimuladora presente en las células presentadoras de antígenos) reveló un aumento notable de la afluencia de macrófagos en el lugar del tumor, lo que parecía interrumpir de manera severa el estroma tumoral (Gajewski et al., 2013).

#### **4.2. Inmunoterapias**

Los avances en genética moderna, han permitido la transferencia adoptiva de células T modificadas para crear funciones inmunitarias mejoradas contra la enfermedad en las que han fracasado las respuestas inmunitarias naturales específicas del cáncer. Consiste en el aislamiento de células T del paciente, modificación, selección y multiplicación de aquellas que reaccionan al tumor (Figura 4).

Estas células T modificadas representan una nueva visión de futuro en la terapia contra el cáncer (Fesnak et al., 2016), teniendo la capacidad de destruir las células cancerosas al mismo tiempo que se aumenta la especificidad frente al tumor debida a la modificación genética de las mismas.





**Figura 4: Fabricación de células T de ingeniería.** (Fesnak et al., 2016).

El proceso de obtención de las mismas podría resumirse en 9 etapas (Figura 3). En primer lugar, las células T se aíslan del paciente por leucaféresis (etapa 1), los cuales pueden enriquecerse por elutriación centrífuga (etapa 2).

A continuación, las células se colocan en cultivo (etapa 3) estimuladas con células presentadoras de antígenos artificiales añadiéndose un vector viral (etapa 4). El cultivo se expande en un biorreactor durante varios días (etapa 5) y después se lava y concentra el producto de células T (etapa 6). Es parte del protocolo apartar muestras para ensayos de control de calidad (etapa 7).

Finalmente, la formulación definitiva es crioconservada (etapa 8) para su posterior descongelación e infusión (etapa 9) (Fesnak et al., 2016). El tiempo de fabricación generalmente es de 5-10 días.

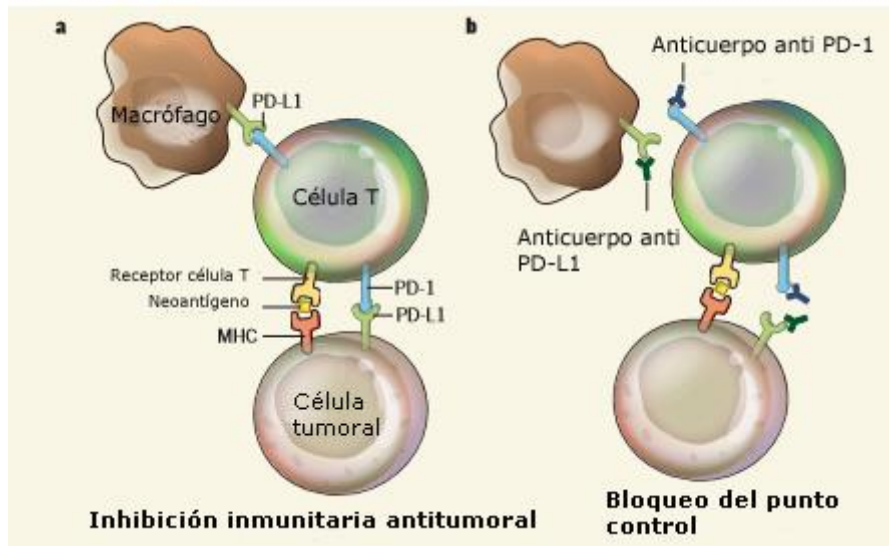
### 4.2.1. Bloqueo del punto de control

Ente los enfoques más prometedores para activar la inmunidad antitumoral está el bloqueo de los puntos de control inmunológicos. Los puntos de control inmune se refieren a las múltiples vías inhibitorias en el sistema inmunológico que son cruciales para mantener la auto-tolerancia y modular la duración y la amplitud de las respuestas inmunes fisiológicas en los tejidos periféricos con el fin de minimizar el daño del tejido colateral (Pardoll, 2014).

Debido a que muchos de los puntos de control inmunes son iniciados por interacciones ligando-receptor, éstos pueden ser fácilmente bloqueados por anticuerpos modulados por formas recombinantes de ligandos o receptores. CTLA-4 y PD-1, al ser receptores inhibidores que cuando están unidos por sus ligandos desencadenan vías inhibitorias que anulan la actividad de las células T, pueden ser bloqueados por anticuerpos, implicando que la inmunidad tumoral puede ser mejorada en múltiples niveles y que las estrategias combinatorias pueden ser diseñadas de manera inteligente guiadas por consideraciones mecánicas y modelos clínicos y preclínicos (Eto et al., 2016).

Las células tumorales expresan mutaciones causantes del cáncer y mutaciones “pasajeras” que promueven la expresión de neoantígenos. Estos neoantígenos son estructuras moleculares que cuando se presentan por las proteínas del MHC son reconocidas por las células T como extrañas, originando una respuesta inmune contra el tumor. Sin embargo, las interacciones entre el receptor PD-1 y su ligando PD-L1 hacen que se activen vías de señalización que inhiben la actividad de células T y, por tanto, la respuesta inmunitaria antitumoral también se ve frenada (Wolchok y Chan, 2014).

De esta manera, el uso de anticuerpos que bloqueen la vía PD-1 por unión al mismo o al ligando PD-L1 es una prometedora estrategia para la reactivación y proliferación de células T, dando lugar a una inmunidad antitumoral mejorada (Figura 5).



**Figura 5: Bloqueo de punto de control.** (Wolchock y Chan, 2014).

Además, CTLA-4 y PD-1 se expresan tanto en células T como en otras células inmunitarias en el microambiente tumoral, lo que puede autolimitar la respuesta antitumoral. Los anticuerpos que bloquean CTLA-4 como ipilimumab y los que bloquean PD-1 como nivolumab han sido aprobados para el tratamiento a pacientes y sus respuestas clínicas han sido generalmente duraderas. Los estudios presentan pacientes libres de regresión durante aproximadamente 11 o 13 años (Wolchok y Chan, 2014). Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos se ha comprobado en determinados tipos de cáncer como melanoma o carcinoma de células renales.

En general, dichos hallazgos sugieren que tumores que hayan sido reconocidos por el sistema inmunológico del paciente, y por tanto presenten células inmunitarias infiltrantes que lleven PD-1 y PD-L1, son particularmente sensibles al bloqueo de control inmune.

Los anticuerpos monoclonales de bloqueo contra PD-1 o PD-L1 han entrado en fase I y fase II de ensayo clínico en pacientes con cáncer avanzado, observándose una tasa de respuesta de aproximadamente un 30% en pacientes con melanoma, carcinoma de células renales y cáncer de pulmón. Los datos preliminares han indicado que la actividad clínica podría limitarse al subconjunto de pacientes con tumores que tienen expresión de PD-L1 e infiltración de células T CD8+ en el microambiente tumoral (Cherkassky et al., 2016).

La reducción de células Treg se persigue utilizando agentes que se dirigen a la expresión superficial de CD25. Un estudio multicéntrico de fase II está actualmente en curso en pacientes con melanoma avanzado utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD25 llamado daclizumab, observándose una reducción duradera del número de células Treg circulantes sin afectar a la respuesta de las células T inducidas infundidas (Masucci et al., 2016).

Con respecto a la anergia de células T, los modelos preclínicos muestran que la exposición a citoquinas homeostáticas puede ayudar a la proliferación de células T anérgicas, tanto en vivo como in vitro. Los ensayos clínicos en fase inicial de IL-7, IL-15 e IL-21 se encuentran en la actualidad en diversas etapas de terminación.

Las respuestas duraderas y la supervivencia distinguen la inmunoterapia del cáncer de la terapia citotóxica (Emens et al., 2017). Los desafíos actuales incluyen la incorporación de la inmunoterapia consiguiendo dosis más refinadas, con una duración adecuada del tratamiento.

#### **4.2.2. Estrategias terapéuticas a seguir en pacientes con tumores con fenotipo carente de infiltración de células T**

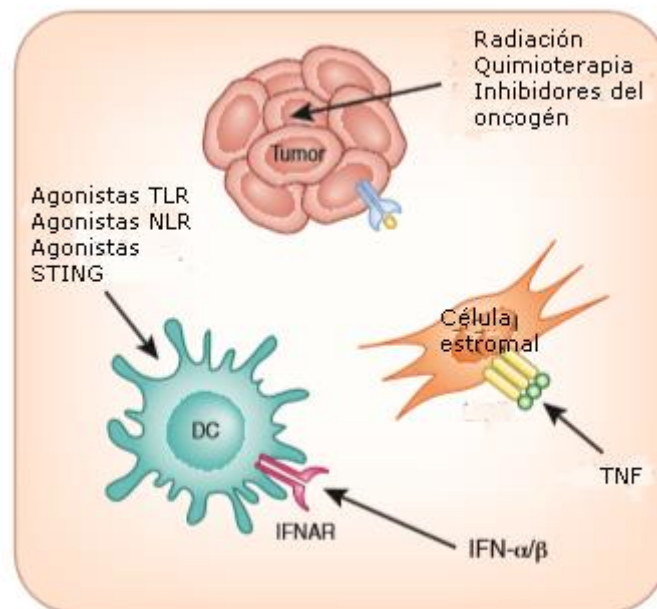
Este tipo de tumores pueden requerir intervenciones novedosas para activar la activación inmune innata y facilitar las señales para el tráfico de células T efectoras. La radioterapia, algunos fármacos de quimioterapia y los inhibidores selectivos de la vía del oncogén pueden conseguir este efecto a través de la muerte celular inmunológica y alteración de la biología de las células tumorales (Yeku y Brentjens, 2016).

El miembro de la superfamilia TNF induce a la producción de citoquinas por células estromales, lo cual lleva a considerar agonistas de vías inmunes innatas incluyendo TLRs (toll-like receptors), NLRs (nod-like receptors) y STING (stimulator of interferon genes protein) para activar células dendríticas e iniciar el cebado productivo de célula T (Figura 6). Los TLRs son receptores transmembrana que forman parte del sistema inmunitario innato y participan en el reconocimiento de estructuras moleculares asociadas a los patógenos, capaces de desencadenar respuestas no solo inmunes, si no también metabólicas propias de estados de enfermedad (Chen y Yu, 2016).

Los NLRs son parte de los receptores de reconocimiento de patógenos y juegan papeles claves en la regulación de la respuesta inmune innata. Pueden cooperar con los receptores toll-like y regular la respuesta inflamatoria y apoptótica. Se encuentran en linfocitos, macrófagos, células dendríticas y también en células no inmunes, por ejemplo, en el epitelio.

STING actúa como sensor de ADN citosólico, activándose la producción de interferones tipo I (INF-alfa e INF-beta). También participa en la muerte celular a través de su asociación con el MHC (Bartneck et al., 2017).

La introducción de interferón I en ambientes tumorales también puede activar células dendríticas a través del receptor para IFN-alfa o IFN-beta y tiene efectos adicionales sobre la vasculatura tumoral.



**Figura 6: Estrategias que ayudan a promover la inflamación y/o la activación inmune innata en el microambiente tumoral. (Park et al., 2011).**

### 4.2.3. Antígenos quiméricos TCAR

La tecnología del receptor antígeno quimérico (CAR), que combina la especificidad de un anticuerpo con la diana terapéutica, la penetración en los tejidos y la destrucción celular objetivo de las células T se describió por primera vez en 1993 (Dotti et al., 2009). El enfoque se basó en la idea de expresar nuevos receptores en la superficie de las células T que permitan a las mismas identificar antígenos proteicos presentes en las células tumorales diana, haciendo a la célula tumoral “visible” para la vigilancia inmunológica.

Los ensayos clínicos más tempranos de células T modificadas genéticamente se basaron en la expresión de receptores de células T (TCR) clonados con afinidad dirigida a antígenos tumorales. Un TCR puede reconocer un antígeno intracelular o extracelular en el contexto de la presentación del complejo de histocompatibilidad (MHC) (Dotti et al., 2009). Más recientemente, se han creado receptores artificiales llamados receptores de antígeno quiméricos (CAR), para potenciar la especificidad de células T modificadas sin necesidad de procesamiento de antígeno o presentación restringida por MHC, es decir, no se ven afectadas por esta estrategia de escape inmunológico (Figura 7).

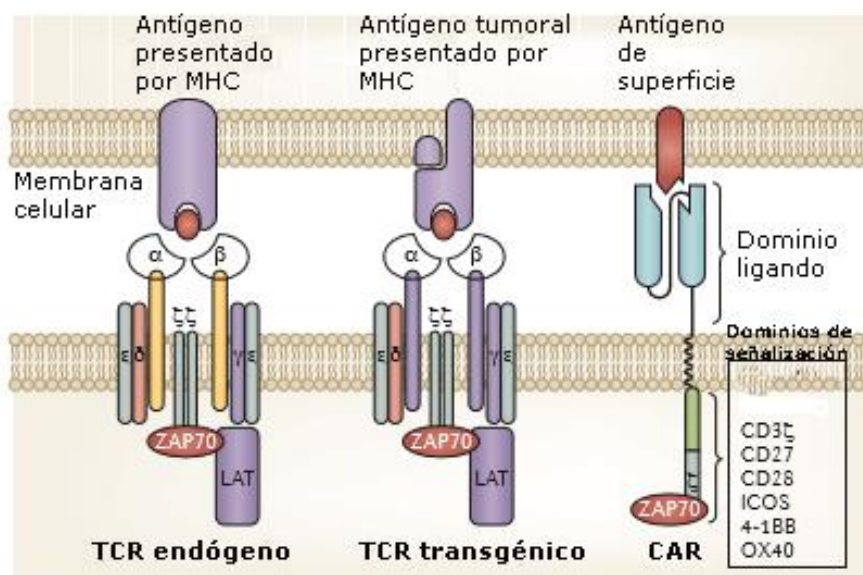


Figura 7: Comparación de la estructura básica de los receptores de células T manipulados y receptores de antígenos quiméricos (CAR). (Fesnak et al., 2016).

Tanto los receptores de células T naturales (TCR) como los transgénicos, reconocen antígenos procesados intracelularmente que deben presentarse en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y requieren señales coestimuladoras para la activación completa de células T (de Charette et al., 2016).

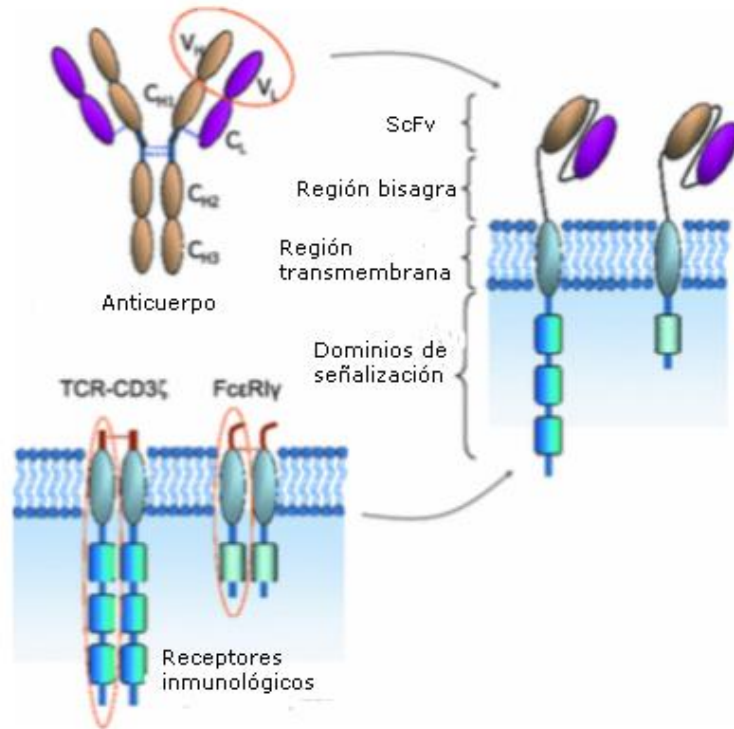
En un intento de extender la especificidad de reconocimiento de los linfocitos T más allá de sus complejos de péptido-MHC clásicos, se ha desarrollado una estrategia genoterapéutica que permite redirigir las células T a antígenos de superficie de células tumorales definidas (Lipowska-Bhalla et al., 2012).

#### ➤ **Estructura básica**

Esta estrategia se basa en el ensamblaje de un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno unido a un dominio espaciador extracelular, una región transmembrana (TM) que ancla el receptor a la superficie celular y un endodominio de señalización. Los endodominios de señalización más frecuentemente utilizados son los que contienen componentes del complejo CD3 asociado a TCR (Geldres et al., 2016).

Los fragmentos de anticuerpo de cadena simple (scFv) consiste en una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL) aislada de un anticuerpo unido por un enlazador flexible (Figura 8).

El scFv determina la especificidad del antígeno CAR y se une a la proteína diana de una manera independiente, no restringida al MHC, con la especificidad y afinidad similar a la del anticuerpo del que se derivó (Garrido et al., 2011). El receptor inmunitario se expresa en la superficie del linfocito T modificado tras la unión del scFv a su antígeno, transmitiéndose una señal de activación al linfocito, que a su vez activa funciones efectoras contra la célula diana autorizando a las células T injertadas a eliminar células tumorales.



**Figura 8: Estructura de un CAR.** (Lipowska-Bhalla et al., 2012).

En la mayoría de los CAR, el dominio de reconocimiento de antígeno está conectado a la región transmembrana por medio de un dominio espaciador extracelular, cuya misión es distanciar el dominio de reconocimiento de la membrana para así hacerla potencialmente más accesible a la unión con su objetivo.

Sin embargo, el requisito para un dominio espaciador extracelular depende de la localización del epítipo diana con respecto a la superficie de la célula diana. Los CAR dirigidos a epítipos situados en el extremo proximal de los antígenos tienden a funcionar bien sin dominios espaciadoras, mientras que los CAR dirigidos a los epítipos cercanos a la membrana celular objetivo parecen demostrar una función mejorada cuando se incluye una región espaciadora flexible (Lipowska-Bhalla et al., 2012).

Estas observaciones sugieren ensayos basados en la modificación de los dominios extracelulares de los CAR con el fin de identificar el receptor óptimo para cada antígeno diana.



De la misma manera, hay una gama cada vez mayor de dominios de señalización intracelular. Estudios iniciales emplearon un único dominio de señalización derivado de la cadena CD3 $\zeta$  o de la cadena  $\gamma$  del receptor Fc de IgE de alta afinidad denominado FcR $\gamma$  (Figura 8). Sin embargo, estudios in vivo demostraron que los linfocitos T de ratón injertados con CD3 $\zeta$  poseían una mejor actividad antitumoral en comparación con aquellos que llevan el dominio de señalización FcR $\gamma$  (Hutchinson, 2014).

### ➤ **Generaciones de CARs**

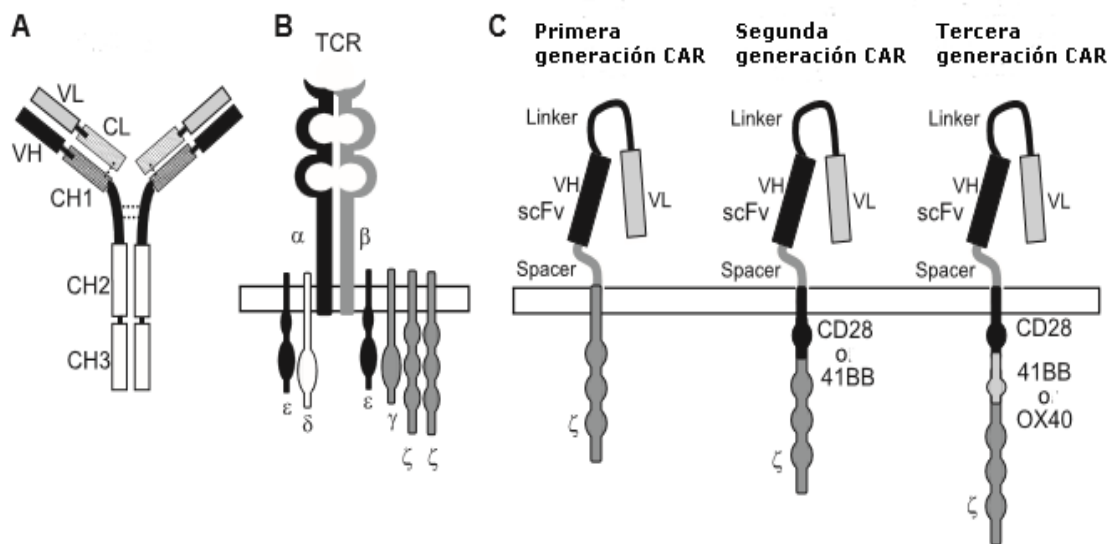
Así comenzó la primera generación de CAR, los cuales engloban a todos aquellos que tienen un solo dominio de señalización (Figura 9). No obstante, la naturaleza modular de los CAR se presta a ingeniería para combinaciones de dominios de señalización que pueden aumentar la potencia de los mismos, ya que la activación completa de las células T requiere múltiples señales, señales coestimuladoras capaces de acoplar completamente su maquinaria efectora y no sufrir apoptosis (Golubovskaya y Wu, 2016).

La vía coestimuladora más estudiada ha sido la ligación de receptores CD28 de células T para formar CAR de segunda generación (Figura 9).

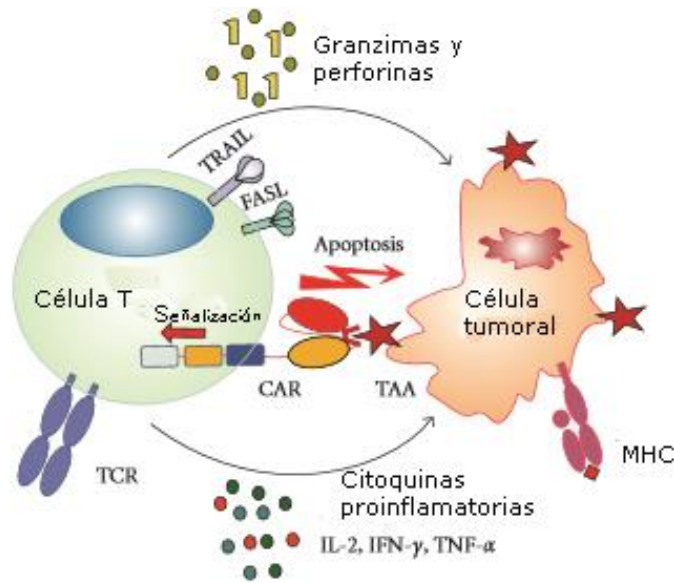
Se ha demostrado que esta ligación a través de la expresión de ligandos coestimuladores B7 en células diana, o la coexpresión de la molécula CD28 junto con los dominios scFv y CD3  $\zeta$  conducen a una mayor proliferación y aumentan la actividad antitumoral de las células T modificadas aumentándose los niveles de citoquinas. Recientes hallazgos también han demostrado que los CAR que contienen el dominio CD28 también podrían rescatar a células T activadas de la muerte celular y mejorar la resistencia de los CAR frente a las células T reguladoras (Treg). Sin embargo, los CAR de segunda generación aun no producen suficientes cantidades de IL-2 para promover la proliferación de células T en ausencia de coestimulación exógena (Huehls et al., 2015).

Por consiguiente, se ha perseguido el desarrollo de la tercera generación de CAR, los cuales además de presentar CD28, tienen otro dominio coestimulador, los cuales suelen ser OX40 o 4-1BB los más utilizados (Figura 9). Los CAR con múltiples motivos de señalización quiméricos han mostrado una mayor proliferación y secreción de citoquinas (por ejemplo, la producción de IL-2) (Shi et al., 2014). Sin embargo, la actividad funcional de las células T no solo depende de la combinación óptima de los dominios de señalización, sino también de su afinidad con el receptor endógeno proporcionado por la célula objetivo.

El objetivo del desarrollo de células T CAR con un incremento en la afinidad funcional es la búsqueda de una mejor direccionalidad de las células T modificadas genéticamente a tumores con niveles bajos de expresión de antígenos (Jena y cols., 2010). La optimización de los dominios de señalización CAR de acuerdo con las células diana podría ser el camino a seguir en el logro de un mejor efecto antitumoral en lugar de la utilización de CAR universales contra todas las células diana. Estos CAR incluyen dominios de señalización derivados principalmente de la familia de proteínas tirosin-quinazas, llamados Syk (en vez de CD3), capaces de desencadenar la activación de las células T con la producción de IL-2 y la consecuente lisis de las células diana (Bird, 2015).



**Figura 9: Generaciones de CARs.** Los CAR de primera generación solo contienen un dominio de señalización de células T que transmite la señal de activación (C, izquierda). Los de segunda generación incorporan además un dominio coestimulador adicional, predominantemente CD28 (C, centro). Los de tercera generación incorporan al menos dos dominios coestimuladores (C, derecha). (Dotti et al., 2009).



**Figura 10: Efectos antitumorales mediados por células T injertadas en CAR.** (Cartellieri et al., 2010).

Las células T modificadas por CAR, pueden reconocer células tumorales por medio de la unión de CAR a su antígeno asociado a tumores (TAA) independientemente de las interacciones TCR-MHC/péptido (Figura 10).

Como resultado, las células T se activan y pueden eliminar eficazmente las células tumorales por la secreción de perforina y granzimas, así como la expresión de FASL y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) (Cartellieri et al., 2010). Todo ello, induce la apoptosis selectiva de las células tumorales. Además, otras células inmunitarias que infiltran tumores pueden activarse por la secreción de citoquinas.

➤ **Injerto de CARs en células inmunes: métodos de transferencia de genes**

Las ventajas del CAR sobre los anticuerpos o ligandos nativos derivan de su asociación física con células T efectoras, teniendo la capacidad de conseguir una biodistribución activa, con migración a través de distintos tejidos a lo largo de gradientes de quimiocinas reclutando múltiples mecanismos citotóxicos propios de una célula T (Lamers et al., 2011). Los protocolos clínicos para la terapia con células T CAR suele implicar el aislamiento de linfocitos T de los pacientes con cáncer, su modificación ex vivo con los genes CAR y su expansión a gran escala.

Los enfoques de manipulación genética de las células T para la introducción del transgen CAR se dirigen a la utilización de vectores que lo integran en el ADN de la célula huésped, usualmente con la administración de IL-2 para soportar la viabilidad de las células T modificadas y eficacia. Estos vectores suelen ser virales, siendo los más utilizados gammaretrovirus o lentivirus (ambos miembros de la familia de los retrovirus).

Tras la infección de la célula diana, el ARN genómico viral es retrotranscrito por la transcriptasa inversa del virus a ADN, que a su vez se inserta aleatoriamente en el ADN de la célula huésped a través de una integrasa viral, convirtiéndose así en parte del genoma de dicha célula (Ramos et al., 2011).

Sin embargo, recientes avances en el desarrollo de la integración de vectores no virales están comenzando a desafiar este monopolio. La ventaja de los virus como vectores reside en la eficacia de la transferencia génica, acortándose los tiempos de cultivo de las células T para alcanzar cantidades clínicamente significativas.

Estos virus recombinantes a menudo tienen un alto costo y requiere largos periodos de cultivo celular para permitir la selección de células T con integrantes estables, por lo que una alternativa prometedora es la electroporación, la cual consiste en la introducción del transgen CAR con ADN en forma de plásmido (Curran et al., 2012).

#### ➤ **Objetivos y potencial terapéutico de las células T CAR**

El principal objetivo de la terapia de células T adoptivas en pacientes con cáncer es establecer una actividad antitumoral eficaz que pueda reconocer y destruir las células malignas independientemente de su localización tisular. Además, esta actividad debe ser persistente para la posible destrucción de células tumorales resurgentes.

Para que las células T CAR alcancen su potencial terapéutico completo, deben tener una expresión robusta y estable. Una estrategia para mejorar la persistencia es alterar el entorno del organismo, por ejemplo, haciendo que el receptor sea linfopénico o incluso aplásico mediante quimioterapia y/o radioterapia. También es necesario que las TCAR posean un tráfico adecuado al sitio del tumor y sean resistentes a factores inmunosupresores relacionados con tumores (Dotti et al., 2009). Actualmente se utilizan varios métodos para expresar moléculas quiméricas en linfocitos T, cada uno con un perfil de eficacia, coste y complejidad.

Además de la inmunoterapia contra el cáncer, los linfocitos modificados CAR han sido aplicados con éxito para el tratamiento de las infecciones por virus, y más recientemente, se han realizado los primeros estudios experimentales utilizando CARs injertados en células T reguladoras (Tregs) para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

➤ **Poblaciones expresadas**

La mayoría de los estudios se han centrado en la modificación genética de los subgrupos de linfocitos más abundantes, los linfocitos CD4+ y CD8+. Ambos son un componente potente de la inmunidad adaptativa que contribuye fundamentalmente a la eliminación de tumores. Las células T CD4+ actúan de una manera independiente del MHC hacia los TAA de una manera similar a como actúan los linfocitos T CD8+, convirtiéndose en células efectoras citolíticas eficientes mediante su injerto con receptores de antígeno quiméricos. El perfil de citoquinas después de la estimulación con antígenos de células T CD4+ injertadas con CAR es más diverso en comparación con sus homólogos de CD8+. Se observan mayores cantidades de IL-2 y TNF- $\alpha$  (Cartellieri et al., 2010).

En un modelo de ratón transgénico se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células T CD4+ y CD8+ injertadas con CAR puede rechazar tumores mucho más eficazmente que las transferencias populares de células T CD8+ injertadas por su efecto sinérgico.

Dado que los procedimientos de transferencia genética no son específicos para las células T, también pueden expresarse otras poblaciones de células inmunitarias, por ejemplo, las células natural-killer (células NK), las cuales presentan potencial lítico intrínseco. Debido a esta característica, también han sido diseñados CARs activadores de células NK (Sarhan et al., 2016). Sin embargo, también hay interés en usar este enfoque para amortiguar las respuestas inmunes a antígenos endógenos mediante la transducción de poblaciones de células T cuya principal función es inhibir las respuestas inmunitarias, como es el caso de las células T reguladoras (células Treg).

Estudios clínicos revelaron que un número de CAR de primera generación mostró cierto éxito en modelos preclínicos y posteriormente en ensayos clínicos. Los tumores objetivo fueron cáncer de ovario, carcinoma de células renales, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin de células B (NHL) y linfoma de células del manto (MCL).

Aunque estos estudios produjeron resultados clínicos bastante modestos, establecieron la viabilidad y seguridad de la terapia de la transferencia adoptiva de CAR, allanando el camino para nuevas mejoras de la capacidad de señalización, originando los CAR de segunda y tercera generación, ambos actualmente en el campo clínico bajo intensa investigación. Alentadoramente, los primeros informes clínicos de estos estudios se han publicado mostrando algunos resultados prometedores (Tabla 1).

Antigen targeted <sup>a</sup>	Disease <sup>b</sup>	CAR generation	CAR endodomain <sup>c</sup>	CAR gene transfer <sup>d</sup>	Phase	Clinical trial gov identifier	Center <sup>e</sup>
CD19	CLL	Second	CD3 $\zeta$ /CD28	RV	I	NCT00466531	MSKCC
CD19	B-ALL	Second	CD3 $\zeta$ /CD28	RV	I	NCT01044069	MSKCC
CD19	Leukemia	Second	CD3 $\zeta$ /CD28	RV	I	NCT01416974	MSKCC
CD19	Lymphoma/leukemia (B-NHL)/CLL	First and second	CD3 $\zeta$ /CD28 versus CD3 $\zeta$	RV	I	NCT00586391	BCM
CD19	B-NHL/CLL	First and second	CD3 $\zeta$ /CD28 versus CD3 $\zeta$	RV	I	NCT00608270	BCM
CD19	Advanced B-NHL/CLL	First and second	CD3 $\zeta$ /CD28 versus CD3 $\zeta$ (EBV)	RV	I	NCT00709033	BCM
CD19	ALL	First	CD3 $\zeta$ EBV	RV	III	NCT01195480*	UCL
CD19	Lymphoma/leukemia	Second	CD3 $\zeta$ /CD28	RV	III	NCT00924326	NCI
CD19	ALL post-HSCT	Second	CD3 $\zeta$ /CD28	RV	I	NCT00840853	BCM

**Tabla 1: Ensayos clínicos representativos de células T CAR (generados a partir de una revisión de la base de datos clinical trials.gov) (Lipowska-Bhalla et al., 2012).**

### ➤ Seguridad de las células T CAR

Recientes ensayos clínicos han revelado diversos peligros potenciales, los cuales aún impiden el camino a una terapia CAR efectiva:

- Una preocupación importante es el **riesgo de toxicidad fuera de la diana terapéutica**, lo que puede resultar en una reacción autoinmune. Esto es debido a que muchos de los antígenos tumorales objetivos de inmunoterapia se comparten con los tejidos normales, siendo los antígenos estrictamente tumorales menos abundantes.

Aunque fisiológicamente estos antígenos se expresan normalmente a niveles bajos en el tejido normal y se sobreexpresan en el tejido tumoral, la respuesta CAR es altamente específica (Tanaka et al., 2017). Esto ocurre especialmente en CARs de segunda y tercera generación, los cuales tienen el potencial de responder a niveles bajos de dianas expresadas fisiológicamente, dando como resultado una potente señal de activación de las células T.

Para intentar solventar la reacción autoinmune, se hace uso de infusiones de dosis más bajas de células T terapéuticas. Para anular la toxicidad aguda observada, a día de hoy se dividen las dosis en dos infusiones. Se extrae como conclusión, que el uso de CAR con menor afinidad por su antígeno diana puede ser ventajoso en la prevención de respuestas autoinmunes. Otra manera de obviar una posible reacción autoinmune es incluir un gen suicida, normalmente timidina quinasa del virus del herpes simple, en células T CAR que podría activarse en caso de toxicidad aguda conduciendo a la eliminación de las células T modificadas (Rosenblum et al., 2016).

- Otra cuestión controvertida está relacionada con la seguridad clínica de los **vectores retrovirales** que codifican los CAR que se utilizan para la introducción del transgen CAR en células humanas. Estos vectores se integran de forma estable en el genoma del huésped creando riesgo de mutagénesis por inserción que puede conducir a una transformación maligna. Sin embargo, no se han observado eventos de este tipo en los pacientes tratados con células T modificadas (Zhang et al., 2016). Aun así, se toman todas las precauciones posibles para minimizar el riesgo, incluyendo el uso de vectores lentivirales y electroporación de ARN.
- La **potencial inmunogenicidad de las propias moléculas CAR** es otra limitación. En estos casos, en la mayoría de las ocasiones la respuesta inmune se dirige contra el dominio extracelular de reconocimiento de antígeno, que normalmente derivan de anticuerpos monoclonales de ratón. El rechazo inmune de células T CAR conduce a su destrucción, reduciendo así la supervivencia y el efecto antitumoral. Sin embargo, dicha limitación se puede evitar mediante el uso de scFv humanizados o derivados de anticuerpos monoclonales humanos.

Además, existe la alternativa de incluir en los protocolos clínicos regímenes de acondicionamiento inmunosupresores que pueden ser beneficiosos para aprovechar plenamente el potencial terapéutico de las células T modificadas con CAR (Spear et al., 2016).

- Por último, el uso de células T autólogas requiere que las **células T modificadas con CAR sean generadas para cada paciente de manera individual**, proceso que resulta exigente desde el punto de vista logístico y económico. De esta manera, para solventar esta limitación, se están dirigiendo actualmente muchos esfuerzos a la creación de células T efectoras universales para su administración a pacientes independientemente de su tipo de MHC (Johnson y June, 2017). No obstante, su uso está amenazado por la enfermedad de injerto-contra el huésped (GvHD), pero se ha demostrado que la respuesta del huésped frente al injerto de células T alogénicas CAR puede ser aprovechado por algunos moduladores del tráfico de células T, lo que potencialmente permite la explotación su efecto terapéutico completo (Hebeisen et al., 2015).

#### ➤ **Resumen de la experiencia clínica en pacientes con cáncer**

Como en la mayoría de los ensayos de fase I, los estudios clínicos publicados han incluido principalmente pacientes cuya enfermedad no responde a terapias estándar, muchos de los cuales recibieron múltiples regímenes de quimioterapia antes de recibir inmunoterapia de células T adoptivas. En uno de los primeros estudios clínicos publicados en cáncer, tres pacientes fueron tratados con linfocitos T transducidos retroviralmente con un CAR específico para la anhidrasa carbónica IX, un antígeno de membrana expresado por células de carcinoma renal y una dosis baja de IL-2. Las células T portadoras de CAR fueron detectadas transitoriamente hasta siete semanas después de la infusión y no se observaron respuestas tumorales (Novosiadly y Kalos, 2016).

Todos los pacientes desarrollaron niveles bajos de anticuerpos y evidencia de toxicidad hepática, este último causado presuntamente por efectos fuera del destino relacionados con la expresión de anhidrasa carbónica IX en los conductos biliares.



Un estudio que empleó un CAR transducido a través de un retrovirus y activado con OKT3 dirigido al receptor alfa-folato ( $\alpha$ FR), expresado en carcinoma ovárico, demostró por análisis de PCR que las células T modificadas genéticamente estaban presentes en la circulación a grandes cantidades durante los dos primeros días después de la infusión, pero se redujeron rápidamente a cifras casi indetectables al cabo de un mes en los 14 pacientes tratados. Un factor inhibitorio fue muy probablemente un anticuerpo desarrollado en 6 pacientes sometidos a prueba durante el periodo de tratamiento, lo que redujo significativamente la capacidad de las células T para responder contra las células tumorales (Spear et al., 2013).

En otros ensayos, se utilizaron células T modificadas con un CAR específico para CD171, una molécula de adhesión celular que se sobreexpresa en el neuroblastoma metastásico y que puede estar implicada en la progresión de la enfermedad. Estas células se sometieron a activación policlonal, electroporación y un marcador, no observándose toxicidades a tejidos que expresan CD171 como el sistema nervioso central. La persistencia de las células T medidas por PCR fue menor de una semana en la mayoría de los pacientes con enfermedad voluminosa, pero hasta seis semanas en un paciente con carga tumoral más pequeña (Hossain et al., 2016).

Recientemente, se han reportado varios ensayos que abordan el tratamiento de las neoplasias linfoides. En uno de los estudios, siete pacientes con linfomas foliculares recibieron infusiones de células T modificadas con CAR específicos de CD20, observándose toxicidades mínimas. Las células T fueron sometidas a activación policlonal y electroporación plasmídica, persistiendo in vivo hasta nueve semanas en pacientes que también recibieron inyecciones subcutáneas de IL-2 (Wrangle et al., 2017).

### **4.3. Futuro y perspectiva**

Originariamente, la gran mayoría del trabajo con CAR se realizó in vitro o en modelos animales, pero fue cuestión de tiempo su utilización, cada vez más importante y asidua en humanos. La inmunoterapia en el cáncer fue considerada como el avance científico más importante por la revista Science hace pocos años. En este punto, se están llevando a cabo un gran número de ensayos clínicos basados en este gran cuerpo de datos preclínicos y sus resultados están comenzando a publicarse con más auge.

La Tabla 1 resume algunos TAA que han sido focalizados, y, aunque la mayoría de los estudios están dirigidos al tratamiento de neoplasias malignas, algunos han abordado infecciones víricas crónicas, como el VIH y trastornos autoinmunes (Bagcchi, 2015).

Es importante destacar que la comprensión de los subconjuntos de células T con particular respeto a los fenotipos óptimos para el injerto, tendrá un impacto sobre las futuras aproximaciones de las células T CAR. Estrategias para mejorar la activación del sistema inmunológico innato y el tráfico de células T en el microambiente tumoral, junto con la transferencia de células T adoptivas para aumentar la frecuencia de células T antitumorales y el bloqueo de vías inmunitarias inhibitorias, pueden ser utilizados en su conjunto para lograr el beneficio clínico en pacientes con fenotipo de tumor no infiltrado por células T o “no inflamado” (Sasu y Chaparro-Riggers, 2016).

Las terapias de punto de control inmunológico son una nueva clase de inmunoterapia contra el cáncer que constituye un importante avance en las últimas décadas, con unos beneficios reproducibles observados en el 20-30% de los pacientes con cánceres previamente incurables. Sin embargo, hay efectos adversos graves y costos considerables asociados con la administración recurrente, por lo que actualmente esta técnica está en continuada investigación.

Por el contrario, la terapia de transferencia celular adoptiva con células T modificadas tienen características que pueden complementar las limitaciones de las terapias de control. Un gran desafío para la transferencia de células T adoptivas es ampliar su alcance a la búsqueda de nuevas dianas moleculares que guiarán a las células T a tumores específicos. El enfoque funciona bien en leucemia y otros cánceres que afectan a células B, otra clase de glóbulos blancos, sin embargo, una meta más complicada son los tumores sólidos, los cuales son menos uniformes que los tumores líquidos (Bayer et al., 2017). Hasta el momento, los investigadores se han centrado en el melanoma y cáncer de riñón debido a su respuesta positiva a las inmunoterapias en los primeros ensayos, siendo particularmente visibles al sistema inmunológico. Los cánceres de mama, colonrectal, pancreático y ovárico son también particularmente propensos a suprimir las células inmunitarias.

En lo que respecta a una prometedora visión de futuro, modelos preclínicos revelan un potente aumento de la eficacia antitumoral con la combinación de células T CAR y bloqueo de control inmune.

## 5. CONCLUSIONES

El largo y sinuoso camino de la inmunoterapia nos ha llevado recientemente a éxitos. La transferencia adoptiva de células T CAR representa una estrategia terapéutica valiosa y atractiva que en un futuro cercano tendrá el potencial de aportar nuevas perspectivas a la inmunoterapia del cáncer y en general, proporcionar una nueva visión en el campo de tratamiento de la enfermedad. Mientras que los ensayos clínicos con CARs de primera generación mostraron un efecto antitumoral bastante modesto, dichos ensayos establecieron factibilidad, seguridad y más importante, allanaron el camino para nuevas mejoras de la función CAR, resultando en la ingeniería de segunda y tercera generación de CARs.

Hasta ahora, los primeros informes clínicos resultan prometedores para el tratamiento de tumores, pero también enfatizan desafíos que se deben emprender para establecer el enfoque de células T CAR como una terapia eficaz y segura contra el cáncer. A medida que se descubran más aspectos acerca de los mecanismos responsables de la activación inmune y la generación de memoria inmunológica, las células T modificadas con CAR probablemente jugarán un papel creciente en la terapia celular de cáncer, infecciones crónicas y trastornos autoinmunes.

Más allá de estos desarrollos científicos, las recientes mejoras técnicas en el procesamiento de células, incluyendo la automatización y mejores sistemas de cultivo, harán que la producción de células modificadas sea más simple y rápida, permitiendo el uso de estas terapias fuera del limitado número de centros donde actualmente pueden administrarse. Paralelamente, estos avances técnicos reducirán los costos de producción, lo que, junto a la baja toxicidad, se traducirá en una relación beneficio/coste enormemente favorable en comparación con los fármacos de quimioterapia convencionales.

Las últimas décadas han demostrado que, con pocas excepciones, ninguna droga o modalidad terapéutica es capaz de curar neoplasias avanzadas. La inmunoterapia, como prometedora estrategia terapéutica, merece consideración por parte de la industria biofarmacéutica y la oncología clínica comunitaria, ya que resultados recientes ya han permitido que el cáncer inmunológico finalmente se lleve a cabo. El control definitivo y la erradicación del cáncer probablemente requerirán un enfoque combinado que incluya inmunoterapia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bagcchi S. T-cell receptor therapy shows promise in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2015 Sep; 16 (9): e429.
2. Bartneck M, Schlößer CT, Barz M, Zentel R, Trautwein C, Lammers T, Tacke F. Immunomodulatory Therapy of Inflammatory Liver Disease Using Selectin-Binding Glycopolymers. *ACS Nano.* 2017 Aug 22.
3. Bayer V, Amaya B, Baniewicz D, Callahan C, Marsh L, McCoy AS. Cancer Immunotherapy: An Evidence-Based Overview and Implications for Practice. *Clin J Oncol Nurs.* 2017 Apr 1; 21 (2): 13-21.
4. Bird L. Immunotherapy: Remote control CARs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Dec; 14 (12): 819.
5. Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, Bippes C, Stamova S, Wehner R, Temme A, Schmitz M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 956304.
6. Chen L, Yu J. Modulation of Toll-like receptor signaling in innate immunity by natural products. *Int Immunopharmacol.* 2016 Aug; 37: 65-70.
7. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, Sadelain M, Adusumilli PS. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest.* 2016 Aug 1; 126 (8): 3130-44.
8. Cortinas, Cristina. Cáncer: herencia y ambiente. México, D.F., MX: FCE - Fondo de Cultura Económica, 2011.
9. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med.* 2012 Jun; 14 (6): 405-15.
10. de Charette M, Marabelle A, Houot R. Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? *Eur J Cancer.* 2016 Nov; 68: 134-147.
11. Dotti G, Savoldo B, Brenner M. Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?". *Hum Gene Ther.* 2009 Nov; 20 (11): 1229-39.
12. Emens LA, Ascierto PA, Darcy PK, Demaria S, Eggermont AMM, Redmond WL, Seliger B, Marincola FM. Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *Eur J Cancer.* 2017 Jun 14; 81: 116-129.
13. Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, Kashihara H, Takasu C, Iwata T, Shimada M. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer.* 2016 Apr; 19 (2): 466-71.
14. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2016 Aug 23; 16 (9): 566-81.
15. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013 Oct; 14 (10): 1014-22.

16. Garg A, Houlihan DD, Aldridge V, Suresh S, Li KK, King AL, Sutaria R, Fear J, Bhogal RH, Lalor PF, Newsome PN. Non-enzymatic dissociation of human mesenchymal stromal cells improves chemokine-dependent migration and maintains immunosuppressive function. *Cytotherapy*. 2014 Apr; 16 (4): 545-59.
17. Garrido C, Romero I, Berruguilla E, Cancela B, Algarra I, Collado A, García-Lora A, Garrido F. Immunotherapy eradicates metastases with reversible defects in MHC class I expression. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Sep; 60 (9): 1257-68.
18. Geldres C, Savoldo B, Dotti G. Chimeric Antigen Receptors for Cancer Immunotherapy. *Methods Mol Biol*. 2016; 1393: 75-86.
19. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2016 Mar 15; 8 (3). pii: E36.
20. Gu Z. 0.1 kilopascal difference for mechanophenotyping: soft matrix precisely regulates cellular architecture for invasion. *Bioarchitecture*. 2014; 4 (3): 116-8.
21. Hearps AC, Agius PA, Zhou J, Brunt S, Chachage M, Angelovich TA, Cameron PU, Giles M, Price P, Elliott J, Jaworowski A. Persistence of Activated and Adaptive-Like NK Cells in HIV (+) Individuals despite 2 Years of Suppressive Combination Antiretroviral Therapy. *Front Immunol*. 2017 Jun 30; 8: 731.
22. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens. *Front Immunol*. 2015 Nov 18; 6: 582.
23. Hossain NM, Chapuis AG, Walter RB. T-Cell Receptor-Engineered Cells for the Treatment of Hematologic Malignancies. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016 Aug; 11 (4): 311-7.
24. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2015 Mar; 93 (3): 290-6.
25. Hutchinson L. Immunotherapy: CAR-modified T cells targeting CD19-curing the incurable. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Dec; 11 (12): 683.
26. Jena B, Dotti G, Cooper LJ. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010 Aug 19; 116 (7): 1035-44.
27. Johnson LA, June CH. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res*. 2017 Jan; 27 (1): 38-58.
28. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of Cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012; 62 (5): 309-335.
29. Lamers CH, Willemsen R, van Elzakker P, van Steenbergen-Langeveld S, Broertjes M, Oosterwijk-Wakka J, Oosterwijk E, Sleijfer S, Debets R, Gratama JW. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. *Blood*. 2011 Jan 6; 117 (1): 72-82.
30. Law AM, Lim E, Ormandy CJ, Gallego-Ortega D. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Apr ;24 (4): R123-R144.

31. Ledford H. Cancer treatment: The killer within. *Nature*. 2014 Apr 3; 508 (7494): 24-6.
32. Ledford H. Sizing up a slow assault on cancer. *Nature*. 2013 Apr 4; 496 (7443): 14-5.
33. Li Y, Yin J, Li T, Huang S, Yan H, Leavenworth J, Wang X. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical application. *Sci China Life Sci*. 2015 Dec ;58 (12): 1233-45.
34. Lipowska-Bhalla G, Gilham DE, Hawkins RE, Rothwell DG. Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Jul; 61 (7): 953-62.
35. Masucci GV, Cesano A, Hawtin R, Janetzki S, Zhang J, Kirsch I, Dobbin KK, Alvarez J, Robbins PB, Selvan SR, Streicher HZ, Butterfield LH, Thurin M. Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume I - pre-analytical and analytical validation. *J Immunother Cancer*. 2016 Nov 15; 4: 76.
36. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011 Dec 21; 480 (7378): 480-9.
37. Muñoz, Alberto. *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Madrid, ES: Hélice; 2004.
38. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2017 May 30.
39. Novosiadly R, Kalos M. High-content molecular profiling of T-cell therapy in oncology. *Mol Ther Oncolytics*. 2016 Mar 30; 3: 16009.
40. Ogino S, Galon J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Aug 9; 8 (12): 711-9.
41. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22; 12 (4): 252-64.
42. Parham, Peter. *Inmunología*. 4ª ed. Distrito Federal, México: El Manual Moderno; 2015.
43. Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol*. 2011 Nov;29 (11): 550-7.
44. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, Martínez A, Nuciforo P, Comerma L, Alos L, Pardo N, Cedrés S, Fan C, Parker JS, Gaba L, Victoria I, Viñolas N, Vivancos A, Arance A, Felip E. Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma. *Cancer Res*. 2017 Jul 1; 77 (13): 3540-3550.
45. Ramos CA, Dotti G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Jul; 11 (7): 855-73.
46. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2016 Feb; 16 (2): 90-101.

47. Sarhan D, Cichocki F, Zhang B, Yingst A, Spellman SR, Cooley S, Verneris MR, Blazar BR, Miller JS. Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 2016 Oct 1; 76 (19): 5696-5706.
48. Sasu B, Chaparro-Riggers J. T Cell Redirecting Therapies for Cancer Treatment. *Curr Cancer Drug Targets.* 2016; 16 (1): 22-33.
49. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell.* 2017 Feb 9; 168 (4): 707-723.
50. Shi H, Sun M, Liu L, Wang Z. Chimeric antigen receptor for adoptive immunotherapy of cancer: latest research and future prospects. *Mol Cancer.* 2014 Sep 21; 13: 219.
51. Shih K, Arkenau HT, Infante JR. Clinical impact of checkpoint inhibitors as novel cancer therapies. *Drugs.* 2014 Nov; 74 (17): 1993-2013.
52. Sie C, Korn T. Dendritic cells in central nervous system autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2017 Feb; 39 (2): 99-111.
53. Spear P, Barber A, Sentman CL. Collaboration of chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells and host T cells for optimal elimination of established ovarian tumors. *Oncoimmunology.* 2013 Apr 1; 2 (4): e23564.
54. Spear TT, Nagato K, Nishimura MI. Strategies to genetically engineer T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 Jun; 65 (6): 631-49.
55. Tanaka M, Tashiro H, Omer B, Lapteva N, Ando J, Ngo M, Mehta B, Dotti G, Kinchington PR, Leen AM, Rossig C, Rooney CM. Vaccination Targeting Native Receptors to Enhance the Function and Proliferation of Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Modified T Cells. *Clin Cancer Res.* 2017 Jul 15; 23 (14): 3499-3509.
56. Vignali D, Kallikourdis M. Improving homing in T cell therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017 Aug; 36: 107-116.
57. Wolchok JD, Chan TA. Cancer: Antitumour immunity gets a boost. *Nature.* 2014 Nov 27; 515 (7528): 496-8.
58. Wrangle J, Paulos CM, Smith TW Jr, Nishimura MI, Rubinstein MP. Inducible Enhancement of T Cell Function and Anti-tumor Activity after Adoptive Transfer. *Mol Ther.* 2017 Aug 19. pii: S1525-0016 (17) 30361-1.
59. Yeku OO, Brentjens RJ. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans.* 2016 Apr 15; 44 (2): 412-8.
60. Zhang Y, Liu X, Zhang J, Zhang C. Site-specific integration of CAR gene into Jurkat T cells with a linear close-ended AAV-based DNA vector for CAR-T engineering. *Biotechnol Lett.* 2016 Sep; 38 (9): 1423-31.