



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
PERSPECTIVAS DEL TRATAMIENTO
BASADO EN CAR T CELLS**

Autor: Almudena Castro Frontiñán

Fecha: Julio 2019

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

ÍNDICE

1	RESUMEN	3
2	INTRODUCCIÓN	3
3	OBJETIVOS	4
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	4
5.1	1. Linfocitos T CAR.....	4
5.1.1	Estructura de un CAR:.....	4
5.1.2	Modificación genética de la célula T:	5
5.1.3	Indicaciones clínicas de los linfocitos T CAR:.....	6
5.1.4	Costes de la terapia y cambio de escala de fabricación:.....	8
5.2	Mecanismos de toxicidad y resistencia:.....	9
5.2.1	Mecanismos de toxicidad:.....	9
5.2.2	Mecanismos de resistencia:	10
5.2.3	Estrategias para mejorar la seguridad y eficacia:.....	12
5.3	Tumores sólidos:	13
6	CONCLUSIONES	16
7	BIBLIOGRAFÍA	17

1 RESUMEN

La terapia basada en linfocitos T CAR ha sido elegida por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) como el avance científico del año 2018. Este tratamiento consiste en modificar genéticamente los linfocitos T de un paciente para que expresen en su superficie celular un receptor de un antígeno diana. Estas células se infunden de nuevo en el paciente y destruyen las células que expresen dicho antígeno. La terapia con células CAR supone un avance significativo en el tratamiento de algunos tumores hematológicos como la leucemia linfoblástica aguda. Su éxito radica fundamentalmente en su elevada especificidad por células tumorales, sin embargo su potencia conlleva la aparición de reacciones adversas graves como el síndrome de liberación de citoquinas que ponen en riesgo la vida del paciente. En los últimos años algunos grupos de investigación trabajan para generalizar el uso de estas terapias en tumores sólidos. La heterogénea expresión de antígenos y el ambiente inmunosupresor dificultan el empleo de células T CAR en tumores sólidos.

2 INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multicausal que se caracteriza por una proliferación anormal y maligna de las células que adquieren capacidad de invadir otros tejidos. La base del tratamiento es la cirugía, la radioterapia y quimioterapia, sin embargo, en muchos casos los pacientes sufren graves manifestaciones adversas a nivel sistémico debido a la falta de terapias específicas e individualizadas para cada uno, en función del tipo de cáncer que padezca. Es por esto que, en las últimas décadas, la investigación en técnicas de inmunoterapia ha cobrado especial interés.

Entre las principales técnicas de inmunoterapia destaca la transferencia celular adoptiva (ACT). Esta terapia engloba a otras como la terapia con células T CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) y la que utiliza linfocitos infiltrantes de tumores (TIL); en ambos casos se utilizan los linfocitos del propio paciente, lo que supone una gran ventaja con respecto al trasplante de médula ósea puesto que evita problemas de rechazo por incompatibilidad de CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad).

1. La terapia TIL consiste en aislar los linfocitos infiltrados alrededor del tumor de un paciente y cultivarlas con IL-2- en el laboratorio para conseguir un número suficiente de células T reactivas. La principal desventaja de esta técnica es que la interleucina 2 induce una gran diferenciación de los linfocitos T, que tienen una baja persistencia en el organismo por lo que en muchos pacientes no se consigue una remisión completa del crecimiento tumoral (Davila ML et al., 2016). A pesar de ello, esta terapia ha sido probada con éxito en melanoma (Rosenberg SA et al., 2011), cáncer de cuello de útero (Stevanovic S et al., 2015) y más recientemente en cáncer metastásico de colon y recto (Tran E et al., 2016).
2. La terapia con linfocitos T CAR ha demostrado ser especialmente eficaz en el tratamiento de tumores hematológicos refractarios a la quimioterapia y/o al trasplante de precursores hematopoyéticos. Se diferencia de la terapia TIL en que, en este caso, los linfocitos del paciente son modificados genéticamente para que expresen un TCR (T cell receptor) específico de un antígeno tumoral específico. Tras su manipulación en el laboratorio, son trasfundidos de nuevo al paciente. El éxito de esta terapia es tal que la Agencia Española del Medicamento aprobó en enero de 2019 Kymriah® (linfocitos T CAR anti CD19) para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) en niños y adultos jóvenes de hasta 25 años y el linfoma B difuso de célula grande, en adultos.

En este trabajo se abordará con mayor detalle la terapia basada en linfocitos T CAR.

3 OBJETIVOS

1. Describir los métodos desarrollados para la obtención de los linfocitos T CAR.
2. Estudiar los mecanismos de resistencia y toxicidad de la terapia basada en linfocitos T CAR.
3. Revisar nuevas vías de investigación con células T CAR para el tratamiento de tumores sólidos.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica en Pubmed, Medline y google académico empleando las palabras clave “Immunotherapy”, “CAR T cells”, “CD19”, “solid tumors”. Así como base de datos CIMA de la agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Las fuentes consultadas se citan en la bibliografía.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 1. Linfocitos T CAR

5.1.1 Estructura de un CAR:

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) son proteínas constituidas por varios componentes: en primer lugar, un dominio extracelular derivado del dominio variables de la cadena ligera de una inmunoglobulina que interacciona con la célula tumoral de forma independiente de CMH (Gamberele, 2014). Este hecho supone una doble ventaja respecto a la terapia TIL: por un lado puede ser utilizado en cualquier paciente independientemente de su CMH (la presentación de antígenos en la terapia TIL es CMH-dependiente) y además ayuda a mitigar uno de los mecanismos de resistencia tumoral como es la regulación a la baja de la expresión de moléculas de histocompatibilidad (Gomes-Silva D et al., 2018). Los CARS cuentan también con un dominio transmembrana y por último con un dominio intracelular que estimula la activación del linfocito (Figura 2). Las terapias de primera generación constan únicamente de la cadena ζ del CD3, sin embargo la persistencia de estos linfocitos activados en el organismo era insuficiente para controlar el crecimiento tumoral, por ello los CARS de segunda generación cuentan con dominios coestimuladores como CD27, CD28, CD134 (OX40) ó CD137 (4-1BB), cuya eficacia clínica ha sido validada de hecho, las terapias comercializadas hasta ahora son CARs de segunda generación. Los receptores de tercera generación contienen dos o más señales coestimuladoras, pero no han demostrado una eficacia clínica superior a los anteriores (**Figura 1**)

En principio, estas células T pueden ir dirigidas hacia cualquier antígeno de superficie ya sea de tipo proteico, lipídico o carbohidrato.

A pesar del gran potencial de estas terapias, existe gran variabilidad entre los diferentes CARS diseñados por distintos grupos de investigación, incluso cuando el antígeno diana sea el mismo, y todavía no se ha podido demostrar las ventajas de unos frente a otros. Parece ser que la longitud del dominio extracelular del CAR juega un papel determinante en el efecto antitumoral puesto que influye en la interacción espacial entre el receptor y el ligando presente en la superficie de la célula cancerosa. Aunque se sabe que hay una distancia óptima, el resultado es muchas veces impredecible, puesto que la expresión del receptor dependerá del método de modificación genética utilizado. (Gomes-Silva D et al., 2018)

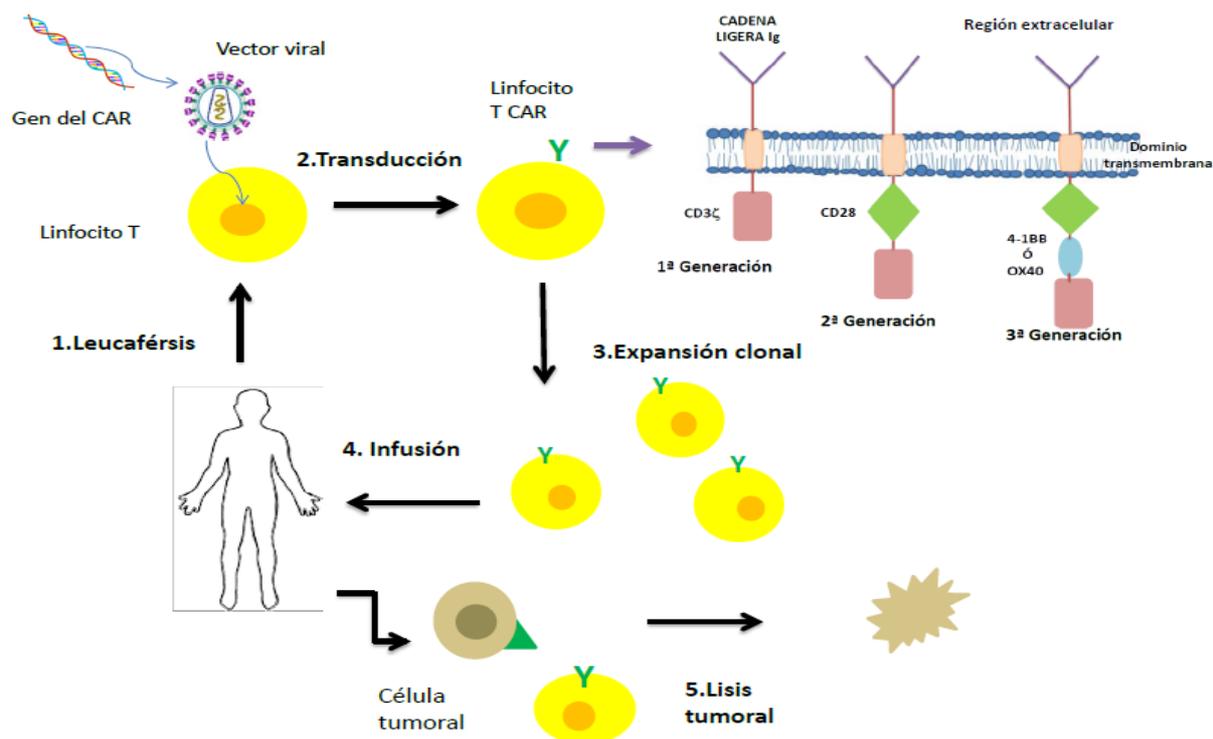


Figura 1: Esquema de obtención de linfocitos T CAR

5.1.2 Modificación genética de la célula T:

El proceso de fabricación de las células T CAR comienza con la obtención de las células polimorfonucleadas del paciente mediante leucaféresis. Esta técnica consiste en obtener el componente celular del plasma, separar las células de interés y devolver las demás al paciente (Figura 1.1). La terapia se inicia tras someter al paciente a un tratamiento de linfodeplección. Los fármacos empleados varían en función del tipo de tumor a tratar.

Una vez que las células T son recolectadas, el gen que codifica para el receptor de antígeno quimérico debe ser introducido en el genoma del linfocito T. Para llevar a cabo este proceso se utilizan dos tipos de retrovirus: γ -retrovirus y lentivirus (Figura 2.2). Ambos son RNA virus con retrotranscriptasa, es decir, son capaces de transcribir RNAm a DNA y posteriormente integrar ese DNA “artificial” dentro del genoma de la célula huésped. Aunque los vectores virales se consideran seguros, puesto que se llevan utilizando 30 años (Schambach A et al., 2013), existe riesgo de mutagénesis. Por ello, actualmente, existen otras alternativas que buscan mejorar el perfil de seguridad y a la vez conseguir mantener la elevada tasa de transducción de los vectores virales, como el empleo del sistema transposon-transposasa. El transposon contiene el fragmento de ADN que codifica para el CAR y otras secuencias repetidas que son recocidas por la enzima transposasa. Esta enzima localiza esas mismas secuencias en el ADN del linfocito e integra el gen mediante un mecanismo de corte-empalme de genes. Para la transfección del sistema se utilizan plásmidos que son fragmentos de ADN circular bacteriano independientes del ADN del microorganismo que contiene genes de resistencia a antibióticos. También se pueden utilizar minicírculos que derivan de estos mismos plásmidos pero que durante el proceso de propagación en *Escherichia coli* han perdido los genes de resistencia a antibióticos, por lo que se consideran más seguros puesto que se evita la posible transferencia de estos genes a las bacterias que constituyen el microbioma humano. Además con los minicírculos se consiguen mayores tasas de transducción. Últimas publicaciones demuestran que los vectores virales tienen afinidad por secuencias del ADN altamente metiladas donde la cromatina es más laxa y que por tanto, son

más activas transcripcionalmente, pero apenas se integra en secuencias transcripcionalmente inactivas. En cambio, el sistema transposon-transposasa muestra una afinidad similar por ambas secuencias. Se ha observado que ni los vectores virales ni los transposones se integran en oncogenes conocidos, ni en secuencias altamente conservadas (Monjezi R et al., 2017). Aunque esta estrategia parece ser muy prometedora, ninguna de las terapias basadas en linfocitos T CAR comercializadas actualmente emplea este método de transducción. Otra estrategia es incorporar el ARNm que codifica para el CAR, mediante electroporación en el citoplasma de la célula, como el material genético no se incorpora al genoma, no hay riesgo de mutagénesis, pero la expresión del receptor en la superficie celular es menos duradera por lo que la acción antitumoral es transitoria (una semana). Esta estrategia sería ideal para evitar efectos adversos derivados de la terapia. Últimas publicaciones también demuestran una expresión uniforme de los receptores CAR utilizando la metodología CRISPR (Eyquem J et al., 2017).

Después de la introducción del CAR en el linfocito, se debe producir la activación y expansión clonal de los linfocitos T CAR⁺ (Figura 1.3). Para que el proceso sea semejante a la activación fisiológica, los linfocitos T han de interactuar con células presentadoras de antígenos (APCs). Se suelen emplear células dendríticas de la línea K562 y, en ocasiones, se pueden modificar genéticamente para que expresen el antígeno que reconoce el CAR y conseguir una expansión selectiva de los linfocitos T CAR⁺. También se pueden utilizar anticuerpos monoclonales que activen CD3 y CD28. El objetivo de este proceso es obtener un número suficiente de células T (superior a 10¹¹ células) para ser reinyectadas en el paciente (Figura 1.4). Sin embargo, debe existir un equilibrio entre el número de células y su grado de diferenciación, puesto que una mayor diferenciación de los linfocitos T conlleva una menor eficacia antitumoral y una menor persistencia *in vivo*. Una estrategia utilizada por algunos grupos de investigación para lograr este objetivo es añadir al medio de cultivo una combinación de citoquinas, por ejemplo IL-2, IL-15 e IL-17 o IL-15 e IL-21. (Gamberele, 2014). Por otro lado, algunos estudios apuntan que la proporción de linfocitos T CD4⁺: TCD8, también influye en el éxito o fracaso de la terapia (Turtle CJ et al., 2016). Los linfocitos T CD8⁺ ejercen su acción citolítica mediante la liberación de perforinas y granzima B, mientras que los linfocitos T CD4⁺ secretan citoquinas que modulan la respuesta inmune (Li H et al., 2017). Estos estudios sugieren que las poblaciones de linfocitos T *naïve* y linfocitos T de memoria son más efectivos en la erradicación de leucemias que las poblaciones de linfocitos T efectores.

5.1.3 Indicaciones clínicas de los linfocitos T CAR:

Como se expone al inicio del presente trabajo actualmente existen dos fármacos basados en linfocitos T CAR aprobados por la agencia europea del medicamento: axicabtagén ciloleucel (Yescarta[®]) indicado para el linfoma B difuso de células grandes refractario o en recaída y el linfoma B primario mediastínico de células grandes para pacientes adultos. Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) se emplea para el tratamiento de en la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) refractaria en pacientes pediátricos y adultos menores de 25 años y para el linfoma B difuso de células grandes (LBDCG) en recaída en pacientes adultos. Ambas terapias contienen linfocitos T CAR anti-CD19. Este antígeno de superficie constituye una buena diana terapéutica debido a que se expresa en la mayoría de los tumores hematológicos, aunque también se expresa en células sanas desde el estadio Pro B hasta los linfocitos B maduras, pero no están presentes en las células plasmáticas ni en las células madre pluripotenciales de la médula ósea (Tasian SK et al., 2015) (Ficha técnica Kymriah, 2018) (Roberts ZJ et al., 2018). El objetivo de los tratamientos para la LLA-B es la curación del paciente y actualmente el tratamiento consta de tres fases: durante la fase de inducción se pretende reducir al máximo las células tumorales, mediante la administración de

glucocorticoides sistémicos, vincristina y antraciclinas. Después se inicia la fase de consolidación que previene las recaídas con agentes alquilantes como la ciclofosfamida, metotrexato y antraciclinas. En pacientes de alto riesgo se recomienda el trasplante alogénico, sin embargo el 50% de los pacientes no son candidatos a un trasplante. En pacientes de bajo riesgo la terapia continúa con un tratamiento de mantenimiento con 6-mercaptopurina, metotrexato y glucocorticoides. La duración del tratamiento completo suele ser de 30-40 semanas. El 15% de los pacientes sufren recaídas durante la terapia. El tratamiento con linfocitos T CAR está dirigido a este reducido grupo de pacientes.

En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo clínico de fase II ELIANA (NCT02435849) con Kymriah® realizados en pacientes con LLA-B o en recaída, este ensayo incluyó a 92 pacientes menores de 25 años, aunque solo se trataron a 75 puesto que algunos murieron durante su inclusión en el estudio (7), 3 pacientes sufrieron eventos adversos que impidieron el empleo de la terapia y en 7 casos hubo complicaciones en la obtención de los linfocitos T. También se recogen los resultados del ensayo JULIET (NCT02445248) con Kymriah® en pacientes con LBDCG, se incluyeron a 147 pacientes, de los cuales solo 99 fueron tratados con el fármaco en estudio, por causas similares a las del estudio ELIANA (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, 2019).

	LLA-B	LBDCG**
Tratamiento de linfodepleción	Fludarabina 30mg/m ² diario durante 4 días Y ciclofosfamida 500 mg/m ² diario durante 2 días*	Fludarabina 25mg/m ² diario durante 3 días Y ciclofosfamida 250 mg/m ² diario durante 3 días
TGR (IC 95%)	81,3% (70,7-89,4)	44,6% (33-57 %)
TRC (%)	60	34
SG a los 12 meses	76,4 %	45,1%
SLE (IC 95%)	50,5% (41,1-72,5)	IND

Tabla 1: Resultados de los ensayos ELIANA y JULIET en fase II. *En caso de cistitis hemorrágica por ciclofosfamida se aconseja citarabina (500 mg/m² diario durante 2 días) más etopósido (150 mg/m² diario durante tres días). ** El 80% de los pacientes incluidos en el estudio padecían LBDCG primario, el 20% restante linfoma folicular transformado (LFT) (los resultados corresponden al primer grupo de pacientes) TGR, tasa global de respuesta; TRC, tasa de respuestas completas; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; IND, información no disponible en el momento del análisis.

Puesto que en ninguno de los dos estudios hubo brazo comparador con medicamentos de referencia, el impacto de estas terapias en la supervivencia global de los pacientes deberá analizarse en estudios de post-comercialización. Se han realizado estudios de blinatumomab (anticuerpo monoclonal bispecífico frente CD19) que podría ser una alternativa terapéutica a los linfocitos T CAR, sin embargo los resultados de este estudio no son comparables con ELIANA o JULIET puesto que solo se incluyeron pacientes adultos, por lo que las muestras poblacionales no son comparables.

La terapia basada en linfocitos T CAR es una opción prometedora para el tratamiento del mieloma múltiple (Ma T et al., 2019). Esta enfermedad se caracteriza por una proliferación maligna de células plasmáticas, que se acumulan de forma anómala en médula ósea, causando fracturas. La enfermedad cursa con otras alteraciones de la hemostasia como anemia, trombocitopenia y leucopenia por lo que los pacientes tiene una mayor predisposición a sufrir infecciones oportunistas. El tratamiento clásico se basa en la administración de un agente alquilante como el melfalán más prednisona, a esta terapia se pueden añadir otros quimioterápicos como la vincristina, doxorubicina, cisplatino o etopósido. Actualmente se

emplean nuevos grupos farmacoterapéuticos como los inhibidores de proteosoma (bortezomib), inmunomoduladores (talidomida, lenalidomida) o anticuerpos monoclonales anti-CD38 (daratumumab). Sin embargo, la supervivencia global a los 5 años es de entre el 23 y el 47%, además el 29% de los pacientes mueren durante el primer año tras el diagnóstico lo que hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas para los pacientes refractarios (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2018). Una de las dianas empleadas en el diseño de linfocitos T CAR es el antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), este es un antígeno específico de células plasmáticas y se expresa de forma uniforme en los pacientes con mieloma múltiple. En la **tabla 2** se muestran los resultados de algunos ensayos clínicos en fase I:

NTC	02215967	02658929	03090659
Origen de scFc	Murino	Murino	Murino
Trasducción	Retrovirus	Lentivirus	Lentivirus
Dominios coestimuladores	CD28	4-1BB	4-1BB
Número de pacientes	12	21	19
Expresión de BCMA requerida	>50%	>50%	Expresión alta
Dosis CAR T	0,3-9 x 10 ⁶ /Kg	5-120 x 10 ⁷ /pt	0,6-7 x 10 ⁶ /Kg
Resultados	EE(8), RP(1), MBRP(2), rRC(1)	EP(1), EE(1), RP(5), MBRP(7), RC(1), rRC(3)	RC(6), cerca de RC(12)

Tabla 2 (Ma T et al., 2019): EE, enfermedad estable; RP, respuesta parcial; MBRP, muy buena respuesta parcial; rRC, rigurosa respuesta parcial; EP, enfermedad progresiva; RC, respuesta completa.

5.1.4 Costes de la terapia y cambio de escala de fabricación:

Como se detalla en los apartados anteriores el proceso de obtención de los linfocitos T CAR consta de múltiples etapas por lo que, el cambio de escala es especialmente complicado. Actualmente laboratorios especializados en fármacos biológicos han desarrollado sistemas automatizados como el CliniMACS ProdigyTM diseñado por Miltenyi Biotec, que permite purificar las células del donante, separarlas, cultivarlas y modificarlas con vectores virales. Sin embargo, la principal limitación de este sistema es que no permite fabricar células T de varios donantes a la vez. Es precisamente esta naturaleza personalizada de la terapia lo que encarece la fabricación. Se estima que solo la modificación genética de las células T de un paciente tiene un coste de 40000 \$. A estos gastos hay que añadir la necesidad de contar con personal altamente cualificado en el manejo de estas terapias, equipos muy sofisticados, hospitalizaciones del paciente y administración concomitante de otros fármacos. Teniendo en cuenta todo esto el precio final del tratamiento se puede multiplicar por 10.

5.2 Mecanismos de toxicidad y resistencia:

Las terapias inmunológicas son un arma de doble filo: por un lado han demostrado ser muy eficaces en el tratamiento de la leucemia, debido a su gran selectividad por células cancerígenas, sin embargo en los ensayos clínicos se han descrito también efectos adversos potencialmente graves. En este trabajo están agrupados en seis categorías: toxicidad *on tumor-on target*, *on target-off tumor*, *off target-off tumor*, neurotoxicidad, genotoxicidad y anafilaxis (figura 2).

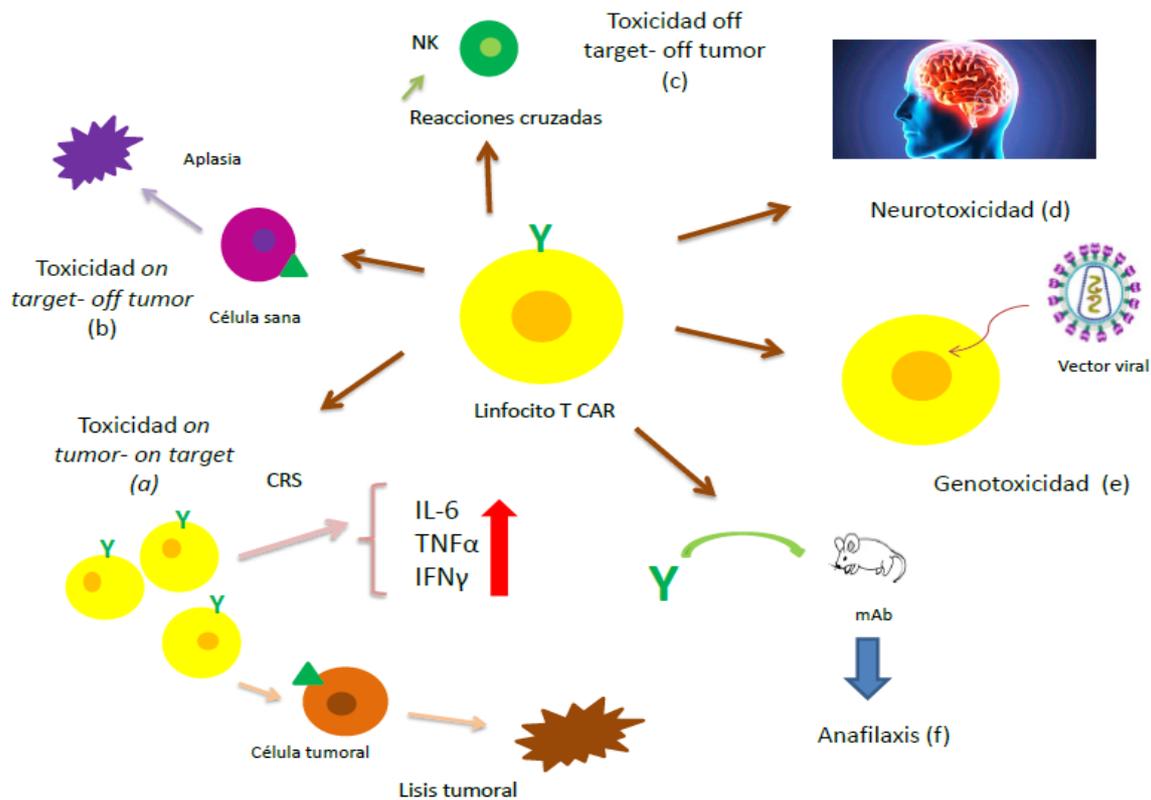


Figura 2: Toxicidad de las células T CAR.

5.2.1 Mecanismos de toxicidad:

Los efectos adversos más frecuentes son aquellos derivados del propio mecanismo de acción de la terapia sobre las células tumorales (*On target-On tumor*) y se muestran en la figura 2a): tras la administración de los linfocitos T CAR se produce una liberación masiva de citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IFN γ y IL-10, mediada por macrófagos y que cursa con fiebre alta, fatiga, anorexia, deterioro de la función respiratoria, hipoxia e hipotensión severa. Estos efectos se pueden paliar con la administración de altas dosis de glucocorticoides y anticuerpos monoclonales como el tocilizumab (anti-IL-6) (Sun S et al., 2018). La mayoría de los pacientes responden bien al tocilizumab, sin embargo, una administración precoz puede conllevar la pérdida de eficacia de la terapia mientras que administrarlo demasiado tarde podría producir la muerte del paciente. Recientemente algunos investigadores han modificado la longitud del dominio intracelular del receptor, lo que ha demostrado, en ratones y en pacientes en fase 1 de ensayos clínicos, una disminución del síndrome de liberación de citoquinas, sin afectar a la capacidad citolítica de los linfocitos T CAR (Huang XF et al., 2019). Por otro lado, la rápida destrucción de células tumorales conlleva un aumento del potasio, del ácido úrico y fostatos lo que compromete la funcionalidad renal. Para evitar las consecuencias negativas del síndrome de lisis tumoral es importante mantener la hidratación del paciente para favorecer la excreción en orina de estos metabolitos. En pacientes de alto

riesgo (con elevada proliferación tumoral y/o insuficiencia renal previa) también se pueden administrar agentes inhibidores de la xantina oxidasa como el alopurinol o el febuxostat, además, en algunos casos puede ser necesaria la diálisis (Cheson BD et al., 2017).

Los efectos **on target-off tumor** (figura 2. b) se deben a que algunos tejidos sanos comparten el antígeno diana con las células tumorales, por ejemplo el antígeno CD19 se expresa en todas las poblaciones de células B, por lo que los linfocitos T CAR anti CD19 destruyen las células sanas y las células tumorales. Como consecuencia el paciente sufre una aplasia prolongada de células B que en algunos casos se puede prolongar durante un año o más (Davila ML et al., 2016). Algunos investigadores postulan que este efecto no es demasiado grave puesto que el paciente suele tener células capaces de producir anticuerpos que no expresan CD19. Aun así, para evitar la aparición de infecciones oportunistas se administran mensualmente inmunoglobulinas y antibióticos. En otros ensayos clínicos, se trataron a pacientes con carcinoma renal metastásico con células T CAR que reconocen la anhidrasa carbónica IX, enzima sobreexpresada en este tipo de tumores, pero que también está presente en células epiteliales de los conductos biliares, por lo que se observó inflamación hepática e infiltración de células T tras la infusión de los linfocitos T CAR. Para disminuir este daño al tejido sano se administraron antes de la infusión de linfocitos T CAR, dosis bajas de anticuerpos monoclonales frente a la ACIX con elevada selectividad por el tejido hepático, ocupando así los sitios de unión de la anhidrasa carbónica impidiendo la unión de los linfocitos T minimizando los efectos adversos *off tumor* de la terapia (Lamers CH et al., 2013). La ocurrencia de este tipo de reacciones adversas hace necesaria la búsqueda de dianas altamente específicas de células tumorales, así como la selección de la dosis mínima eficaz de células T CAR (Sun S et al., 2018).

En la figura 2c se muestran los efectos **off target** de los linfocitos T CAR, estos se producen cuando, al contrario de lo que cabría esperar, las células T modificadas atacan a tejidos sanos que no portan el antígeno diana en su superficie. La mayoría de los CARs están constituidos por un dominio derivado de la cadena variable de un anticuerpo monoclonal, que aunque suelen ser seguros se han descrito reacciones cruzadas con antígenos presentes en el miocardio, con consecuencias fatales para los pacientes (Bonifant CL et al., 2016).

Otra de las reacciones adversas más frecuentes de estas terapias es la **neurotoxicidad** (figura 2. d) que se manifiesta con encefalopatía, afasia y convulsiones. Aunque se desconocen los mecanismos fisiopatológicos responsables de estos daños, en los casos más severos se han encontrado niveles altos de citoquinas e infiltración de linfocitos T CAR en el líquido cerebroespinal, por lo que se cree que las causas son principalmente infamatorias. Para mitigar este síndrome se suelen administrar corticoesteroides y tocilizumab. Aunque se ha visto que este último no atraviesa la barrera hematoencefálica, clínicamente si se ha probado su eficacia. Conocer el mecanismo fisiopatológico sería especialmente útil para evitar la neurotoxicidad. En la mayoría de los casos es transitoria y solo algunos pacientes presentan una ligera amnesia (Davila ML et al., 2016).

Las reacciones de **genotoxicidad** que se muestran en la figura 2e se detallan en el apartado 1.2 de este trabajo.

Además, como consecuencia del tratamiento de linfodeplección previo a la inmunoterapia el paciente puede sufrir anemia, coagulopatías y sepsis neutropénica. También se pueden producir **reacciones anafilácticas** debido a que la mayoría de los CARs proceden de anticuerpos monoclonales murinos purificados (Figura 2f).

5.2.2 Mecanismos de resistencia:

Las nuevas terapias anti CD19 han revolucionado el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda refractaria consiguiendo tasas de remisión del 80%. Sin embargo es preocupante que entre el 7% y el 25% de los pacientes tratados, sufren recaídas de su enfermedad debido a una

resistencia a la terapia. Los principales mecanismos de evasión de las células tumorales a la inmunoterapia se resumen en la figura 3. La mayoría de los casos se deben a mutaciones en los exones 2 y 5 del gen que codifica para el anti CD19 CAR lo que implica una pérdida de expresión del receptor en la superficie celular (Orlando EJ et al., 2018) (figura 4a). En otro estudio se describe un único caso de un paciente varón sometido al tratamiento Kymriah®. El paciente experimentó una remisión completa de su enfermedad pasados 28 días de la infusión de los linfocitos T CAR, sin embargo, a los 8 meses, se detectó una expansión clonal de una nueva línea celular cancerígena CD19⁺, al analizar muestras de la médula ósea se pudo concluir que esta línea celular procedía de una única célula cancerígena que había sido modificada para expresar el CAR. Una vez que el receptor se expresó en la superficie celular cancerígena enmascaró su propio epítipo dando lugar a la proliferación de esta célula (figura 4b) (Rafiq S et al., 2018) (Ruella M et al., 2018). Este caso demuestra la necesidad de mejorar los procesos de obtención de las células T CAR asegurando que ninguna célula cancerígena sea modificada genéticamente.

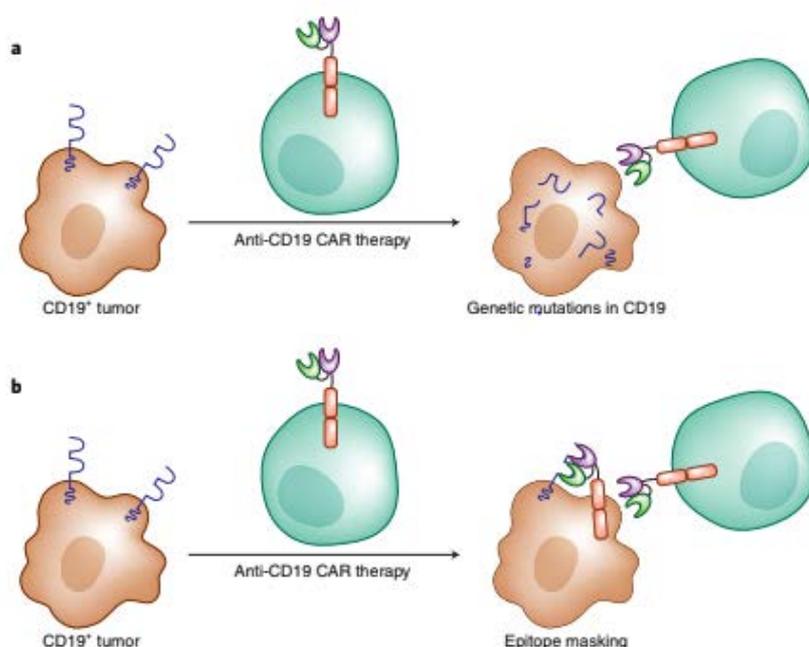


Figura 3: mecanismos de evasión de la terapia T CAR (Rafiq S et al., 2018)

En otro estudio (Gardner R et al., 2016) se relaciona el empleo de los linfocitos T CAR antiCD19 para tratar la leucemia linfoblástica aguda con el cambio de fenotipo tumoral de linfoide a mieloide. Se desconoce el mecanismo, pero los investigadores creen que la terapia podría inducir una desdiferenciación de las células tumorales perdiendo algunos marcadores de la línea linfoide, incluido el antígeno de superficie CD19, pasando a expresar otros de la serie mieloide. Además se observó que los pacientes que sufrieron una leucemia mieloide aguda tras la terapia T CAR, padecieron también el síndrome severo de liberación de citoquinas, por eso se piensa que las citoquinas podrían ser las responsables de la desdiferenciación.

5.2.3 Estrategias para mejorar la seguridad y eficacia:

Para evitar el escape de las células tumorales del control del sistema inmunológico, se han diseñado linfocitos T CAR multiespecíficos, también llamados TanCARS. Esta estrategia se emplea mucho en el tratamiento de tumores sólidos, pero hay diversos ensayos clínicos en curso para tumores sanguíneos. La mayoría combinan el CD19 con el antígeno de superficie CD22, que se expresa en todas las células de la serie B, comienza a expresarse en las células pre-B y el antígeno se pierde en las células plasmáticas. Además las terapias T CAR anti-CD22 tienen un perfil de seguridad similar a las terapias ya aprobadas anti CD19. En algunos casos ha demostrado ser efectivo para tratar leucemias refractarias al tratamiento con anti CD19 (Haso W et al., 2013) (Yang F et al., 2019) (Fry et al., 2018).

La aplasia de células B o el síndrome de liberación de citoquinas (CRS) se deben en mayor o menor medida a la elevada persistencia de los linfocitos T CAR en el organismo. Por ello se han desarrollado estrategias que permiten destruir las células CAR una vez que han eliminado las células tumorales. El primer método que se ha utilizado es la introducción del gen que codifica para la timidin kinasa del virus Herpes simplex en el CAR. Esta enzima cataliza la trifosforilación del ganciclovir (fármaco empleado para el tratamiento de infecciones por Citomegalovirus en personas inmunocomprometidas). Este derivado trifosforilado es tóxico para las células e induce la muerte de las mismas. Esta estrategia está en fase III de ensayos clínicos para revertir las reacciones de injerto frente al huésped en los trasplantes (Bonini C et al., 2007) (Greco R et al., 2015). Este método presenta algunas limitaciones debido a la inmunogenicidad de la proteína timidin kinasa en humanos. Además la reactivación de una infección por citomegalovirus, se trataría con ganciclovir y eso conllevaría la destrucción indeseada de las células trasplantadas (las reactivaciones son frecuentes en estados de inmunosupresión, y además la mayoría de la población presenta serología positiva de este virus). Es por ello que se están estudiando también otras alternativas. En un estudio se construyó un receptor de antígeno quimérico constituido por el antígeno diana CD19, la molécula coestimuladora CD28, el gen que codifica para la interleucina-15 que produce una activación y proliferación muy rápida de los linfocitos T CAR. Para controlar esta proliferación se incorpora también un “gen suicida” el icasp9. Cuando al paciente se le administra una dosis de la molécula AP20187, esta se fusiona con icasp9, a continuación se produce una dimerización del complejo casp9-molécula AP20187 que activa las caspasas 3,6 y 7, estas inducen la fragmentación del ADN celular y la consecuente muerte por apoptosis del linfocito. Esta estrategia ha sido validada con éxito en el trasplante de precursores hematopoyéticos para mitigar la enfermedad de injerto contra huésped. En este caso son los linfocitos T del donante los que se modifican para que expresen el gen icasp9 (Li H et al., 2017) (Hoyos V et al., 2010) (Budde LE et al., 2013). Con esta estrategia se consigue la eliminación de las células icasp9⁺ en 30 minutos tras el cese de la administración (la infusión de la molécula dimerizadora dura aproximadamente 2 horas). Otra estrategia empleada para eliminar los linfocitos T CAR es utilizar proteínas de superficie “truncadas” que son reconocidas por anticuerpos monoclonales administrados una vez se logra el efecto terapéutico deseado, y se produciría la lisis de los linfocitos por citotoxicidad mediada por anticuerpos y/o por el complemento. Philip et al consiguen que los linfocitos T en modelos animales expresen una proteína trucada de 136 aminoácidos (RQR8) derivada del CD34 y del CD20 que es reconocida por el anticuerpo monoclonal rituximab. Aunque el perfil de seguridad del rituximab está probado clínicamente puesto que se emplea también para el tratamiento de la artritis reumatoide, este podría inducir también la destrucción de linfocitos B sanos que expresen el CD20 dando lugar a una inmunosupresión y al aumento de infecciones oportunistas (Philip B et al., 2014). Por ello, investigaciones más recientes (Paszkiwicz PJ et al., 2016) recogen el desarrollo de un CAR que expresa un receptor modificado del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), los dominios extracelulares I y II del receptor se eliminan

para evitar la unión de los ligandos fisiológicos (EGF), así como los dominios intracelulares con actividad tirosina Kinasa que transmiten señales al núcleo. Una vez que los linfocitos T CAR expresan este receptor en su superficie, se administra el anticuerpo monoclonal cetuximab. Estos estudios reflejan el potencial de esta estrategia para revertir la aplasia de células B en modelos animales en 7 semanas. Todavía está por determinar cuál es el momento ideal para administrar el cetuximab sin disminuir la eficacia de la terapia. Para ello habría que tener en cuenta el riesgo de recaída de cada paciente.

5.3 Tumores sólidos:

Dada la eficiencia demostrada por las terapias basadas en linfocitos T CAR para el tratamiento de tumores hematológicos, los investigadores trabajan para generalizar el uso de estas terapias también en tumores sólidos. Sin embargo, existen varias diferencias fundamentales entre los tumores sólidos y los llamados tumores “líquidos” o tumores sanguíneos que disminuyen el potencial curativo de los linfocitos T CAR en tumores sólidos (**Figura 4**) (Zang BL et al., 2016) (Newick K et al., 2016):

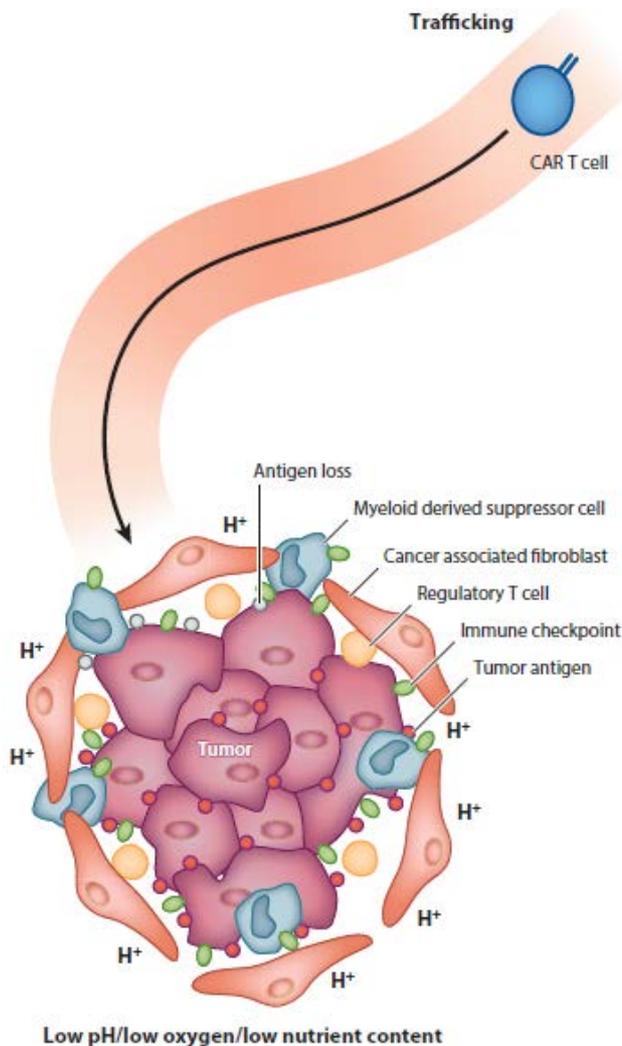


Figura 4: Características del microambiente que rodea a los tumores sólidos y complica el éxito del tratamiento con linfocitos T CAR (Newick K et al., 2016).

1. La expresión de antígenos en la superficie de las células tumorales es heterogénea. El antígeno diana ideal es aquel cuya expresión está restringida a células cancerosas, para evitar, en la medida de lo posible, los efectos *on target-off tumor* y además ese antígeno debe expresarse en el 100% de las células cancerígenas de lo contrario se podría producir resistencia a la terapia. Además para que la terapia basada en linfocitos T CAR sea efectiva los antígenos diana deben expresarse en la superficie tumoral para que puedan ser reconocidos, de manera que los antígenos intracelulares no son una diana adecuada. Algunos investigadores han empleado el antígeno E7/E6 del virus del papiloma humano para el tratamiento de tumores cervicales o de ovario producidos por la infección por este virus (Chabeda A et al., 2017) (Ramos CA et al., 2013). También son buenas dianas antígenos oncofetales mutados como el EGFRvIII que está sobreexpresado en el 30% de glioblastoma en pacientes adultos (Sahin A et al., 2018) (O' Rourke DM et al., 2017). Este antígeno, se cree, que aumenta la proliferación de células tumorales, así como su capacidad invasora y confiere resistencia a tratamientos convencionales, por lo que su presencia se considera un indicador de mal pronóstico. Durante los procesos tumorales se produce una glicosilación anómala de proteínas de superficie, por ello han sido ampliamente estudiadas como posibles dianas terapéuticas, entre ellas la mucina 1 (MUC 1) se expresa en cáncer de ovario, cérvix, endometrio, estómago y páncreas entre otros. Esta proteína anómala modifica la adhesión de las células cancerígenas, por lo que influye en la aparición de metástasis (Wilkie S et al., 2008) (Posey Jr. AD et al., 2016). Otra glicoproteína estudiada es la mesotelina que se encuentra sobreexpresada en cáncer de ovario y páncreas aunque también se expresa en tejidos sanos como pericardio, pleuras y peritoneo (Lanitis E et al., 2012) (Beatty GL et al., 2014) (Morello A et al., 2016).
2. Una vez que se selecciona el antígeno diana, los linfocitos T CAR deben infiltrarse en el tumor. El acceso de los linfocitos desde la circulación periférica hasta su lugar de acción es un proceso que consta de varias etapas: los linfocitos T activados deben adherirse al endotelio tumoral y después se produce la extravasación de las células CAR hasta el tumor. En estas etapas es crítica la interacción entre las citoquinas secretadas por las células cancerígenas y los receptores de citoquinas que se expresan en la superficie de los linfocitos T, sin embargo, la mayoría de los tumores sólidos se caracterizan por una baja secreción de determinadas citoquinas y de moléculas de adhesión así como una vascularización anómala. Una estrategia para hacer frente a este problema es construir CARs que expresen receptores de citoquinas como el CCR2b para aquellos tumores que secretan elevadas cantidades de IL-2 (Moon EK et al., 2011) (Craddock JA et al., 2010). Los tumores sólidos producen elevadas cantidades de PGE-2 y de adenosina, que activan la proteín kinasa A (PKA), esta enzima inhibe la activación de los linfocitos T. En estudios recientes, se han diseñado CARs que inhiben la PKA de los linfocitos T, lo que hace que aumente la expresión basal de determinados receptores de citoquinas como el CXCR3 que se une a la IL-10 producida por las células cancerígenas y del VLA4 que se une a VCAM-1 y a la fibronectina. Estos hechos facilitarían el acceso de los linfocitos T al tumor (Newick K et al., 2016).
3. Los tumores sólidos, a diferencia de los tumores hematológicos, están rodeados de un ambiente ácido, hipóxico e inmunosupresor. El estroma ocupa aproximadamente el 90% de la masa tumoral, está constituido por fibroblastos, tejido conectivo, células epiteliales, linfocitos, granulocitos y macrófagos. Estas células no tumorales que rodean a las células cancerígenas son buenas dianas terapéuticas por varias razones: son genéticamente más estables que las células cancerosas por lo que la expresión de

antígenos es más uniforme y constante en el tiempo, además contribuyen al crecimiento tumoral y a la resistencia a terapias convencionales formando una barrera física que dificulta el acceso de los fármacos, promueven la proliferación y la invasión tumoral así como la angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento y citoquinas, producen determinados factores que promueven un ambiente inmunosupresor y expresan moléculas inhibitoras de la activación de linfocitos T como PD-L1 y PD-L2. Diversos grupos de investigación emplean la proteína activadora de fibroblastos (FAP) como diana de linfocitos T CAR como tratamiento complementario a la quimioterapia para el mesotelioma (Wang L-C S et al., 2014) (Kakarla S et al., 2013) (Schuberth PC et al., 2013). Los resultados son prometedores puesto que demuestran un cese del crecimiento tumoral, dado que FAP se expresa en muchos tumores epiteliales incluidos, mama, páncreas, colorrectal, melanoma y pulmón. El bloqueo de esta proteína podría ser de utilidad en todos ellos. Aunque la eficacia parece claramente demostrada, existen discrepancias en cuanto a la seguridad. Los ensayos citados anteriormente no encuentran daño medular, sin embargo otros sí aprecian marcada caquexia y anemia (Tran E et al., 2013). Otra alternativa es la de construir CARs modificados para que expresen enzimas que rompen la matriz extracelular tales como la heparanasa que degrada el heparan sulfato (Caruana I et al., 2015). Las células estromales, en particular las células dendríticas y los macrófagos secretan mediadores proinflamatorios, entre ellos el interferón- γ (IFN- γ). Esta molécula promueve la expresión de PD-L1 (también llamada B7), antígeno reconocido por los receptores PD-1 que se expresan en la superficie de los linfocitos T efectores. Como consecuencia de esta interacción, se inhibe la proliferación de linfocitos T efectores. A nivel fisiológico este mecanismo previene el daño tisular y la propagación descontrolada de la inflamación. Pero, de esta forma, los tumores pueden evadir el control del sistema inmune (Chen L et al., 2015). Es por esto que el PD-L1 es una buena diana terapéutica, y en los últimos años se han diseñado linfocitos T CAR que expresan el receptor PD-1 (Liu X et al., 2016) (Li S et al., 2017) (Cherkassky L et al., 2016) y están en estudio como alternativa a los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 (pembrolizumab y nivolumab) ya empleados con éxito en el tratamiento del melanoma, el cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma renal metastásico (Hargadon KM et al., 2018). Otro receptor inhibitorio y posible diana terapéutica es el CTLA-4. Su ligando es también la molécula B7. En los individuos sanos impide la activación de linfocitos T efectores frente a antígenos propios, por lo que emplearlo como diana tendría más riesgo de reacciones autoinmunes.

La terapia con células T CAR podría ser de utilidad en el cáncer de mama triple negativo (no están sobreexpresados ni el receptor de estrógenos, ni el de progesterona ni el receptor de factor de crecimiento epidérmico, HER2) que supone el 15% de todos los tumores de mama y es resistente a la mayoría de las terapias convencionales, de ahí la necesidad de investigar terapias alternativas. Se han diseñado linfocitos T CAR frente al TEM8, es una proteína de superficie tipo integrina que ejerce un papel importante en la invasión y metástasis y que se expresa tanto en células tumorales como en el estroma. Los ensayos in vitro e in vivo en modelos murinos han demostrado el potencial de estas terapias para disminuir la progresión tumoral y los procesos de angiogénesis (Byrd TT et al., 2018).

Otros investigadores utilizaron el receptor de folato α (FR α) como diana de los linfocitos T CAR, la expresión de este receptor está aumentada precisamente en cáncer de mama triple negativo puesto que el 17 β -estradiol regula a la baja la expresión del receptor de folato, dado que los elementos de respuesta a hormonas inhiben directamente al promotor del gen del FR α .

Este receptor también está sobreexpresado en cáncer de ovario y pulmón (Song DG et al., 2016). En modelos animales con células tumorales humanas se ha demostrado el efecto citolítico de los linfocitos T CAR sobre las células $FR\alpha^+$. Además se cree que la eficacia del tratamiento aumentaría si se administran inhibidores de histona desacetilasa y dexametasona puesto que estos fármacos aumentan la transcripción del gen del $FR\alpha$.

El glioblastoma es el cáncer cerebral más común y también el más agresivo, el 60% de estos tumores sobreexpresan el receptor $\alpha 2$ de la interleucina 13 ($IL13R\alpha 2$) y este receptor no se expresa en tejido cerebral sano, por lo que es una buena diana para el empleo de linfocitos T CAR. Recientemente se ha iniciado un ensayo clínico en fase I en el que se ha logrado la remisión completa en un paciente (NCT02208362). En modelos animales se ha demostrado la destrucción selectiva de las células que expresan este receptor. Estos estudios también destacan que la administración intracraneal aumenta la eficacia de la terapia. Además la administración concomitante de dexametasona a dosis intermedias o elevadas compromete el éxito del tratamiento, por eso en el ensayo clínico solo se permiten dosis menores de 6 mg/día de dexametasona para controlar los síntomas neurológicos de la enfermedad (Brown CE et al., 2018).

6 CONCLUSIONES

- Las células T CAR de segunda generación han demostrado eficacia en el tratamiento de la LLA y de LBDCG, con tasas de supervivencia global del 81 y 44% respectivamente. Aunque los métodos de manipulación genética de los linfocitos T han sido correctamente validados, dado el potencial mutagénico que implica el empleo de vectores virales para la trasducción de las células CAR se debe optimizar el empleo de transposones o plásmidos con el fin de lograr similar persistencia in vivo de las células que los vectores virales.
- El 80% de los pacientes tratados con linfocitos T CAR desarrollan síndrome de liberación de citoquinas. Conocer los mecanismos fisiopatológicos asociados a este proceso permitiría optimizar el manejo de este y otros eventos adversos. La pérdida de expresión de la diana parece ser el principal mecanismo de resistencia a la terapia. Se han desarrollado estrategias prometedoras como los CARs multiespecíficos y los CARs inhibidores que previenen las resistencias y la toxicidad *on target- off tumor*.
- La elección correcta de la diana terapéutica es crítica en el tratamiento de tumores sólidos. Los linfocitos T CAR inhibidores del FAP o del PD-1 parecen ser las estrategias más prometedoras en este campo. Se han realizado avances importantes en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón y glioblastoma entre otros.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Davila ML, Brentjens RJ. CD19-Tarjeted CAR T Cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2016 October; 14(10): 802-808.
2. Rosenberg SA, Jang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ *et al*. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T cell cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1; 17(13): 4550-7.
3. Stevanovic S, Draper LM, Langhan MM, Campbell TE, Kwong LM, Wunderlich JR *et al*. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-tarjeted tumor-infiltrating T cells. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 May 10; 33(14): 1543-50.
4. Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L *et al*. T-cell transfer therapy tarjeting mutant KRAS in cancer. *The new England Journal of Medicine*. 2016 Dec 8; 375(23): 2255-62.
5. Gamberela, Romina (2014).CAR T cells: fundamentos de esta innovadora terapia inmunológica. *Hematología*. 18:28-31.
6. Ramos, D. G. (2018). Cancer immunotherapy using CAR T Cells: from the research bench to the assembly line. *Biotechnol J*.
7. Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Human Gen Therapy*. 2013 Feb; 24(2): 132-142.
8. Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, Schleef M, Schmeer M, Einsele H *et al*. Enhanced CAR T cell engineering usintg non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Nature International Journal of Science*.2017; 31: 186-94.
9. Equem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM *et al*. Tarjeting a CAR to TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumor rejection. *Nature International Journal of Science*.2017 Mar 2; 543(7643): 113-117.
10. Turtle C J, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, *et al*. CD19 CAR T Cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients.*The journal of Clinical Investigation*. 2016 Jun 1; 126(6): 2123-38.
11. Li H, Zhao Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Protein & cell*. 2017 Apr 7; 8(8):573-89.
12. Tasian, Sarah K.; Gardner, Rebecca A.CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL).*Therapeutic Advances in Hematology*. 2015; 6(5) 228-41.
13. *Ficha técnica Kymriah. (2018). Agencia Europea del Medicamento.*
14. Roberts ZJ, Better M, Bot A, Roberts MR, Ribas A, et al. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leukemia & Lymphoma*. 2018; 59(8):1785-96.
15. AEMPS: Informe de posicionamiento terapéutico de tisagenlecleucel (Kymriah®) en el tratamiento de pacientes pediátricos y adultos hasta 25 años con leucemia linfoblástica aguda de células B refractaria, en recaída post-trasplante, o en segunda recaída o posterior; y de pacientes adultos con linfoma difuso de células grandes B recaído/ tras dos o más líneas de tratamiento sistémico. [Internet]. 25/06/2019. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Consultado en fecha: 13/06/2019. disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-tisagenlecleucel-kymriah-LAL-LCGB>
16. Ma T, Shi J, Liu H. Chimeric Antigen Receptor T cell targeting B cell maturation antigen immunotherapy is promising for multiple myeloma. *Annals of Hematology*. 2019 Jan 28; 98: 813-22.
17. AEMPS: Informe de posicionamiento terapéutico de daratumumab (Darzalex®) en mieloma múltiple. [Internet]. 21/06/2018. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Consultado en fecha: 23/06/2019. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/home-enfermedad.htm#Mieloma-Multiple>.
18. Sun S, Hao H, Yang G, Zhang Y, Fu Y. Immunotherapy with CAR- Modified T Cells: Toxicities and Overcoming strategies. *Journal of Immunology Research*. 2018 Apr 17; 2018, article 2386187.

19. Huang XF, Ying Z, Xiang X, Liu Y, Kang X, Song Y *et al.* A safe and potent antiCD19 CAR T Cell Therapy. *Nature Medicine*.2019 Apr 22; 25: 947-53.
20. Cheson BD, Heitner Enschede S, Cerri E, Desai M, Potluri J, Lamanna N *et al.* Tumor Lysis Syndrome in Chronic Lymphocytic Leukemia with Novel Targeted Agents. *The Oncologist*. 2017 Nov; 22(11): 1283-91.
21. Lamers CH, Sleijfer S, van der Steenbergen S, van Elzaker P, van Krimpen B, Groot C *et al.* Treatment of Metastatic Renal cell Carcinoma with CAIX CAR engineered CAR T cells: Clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Molecular Therapy*. 2013 Apr; 21(4): 904-12.
22. Bonifant CL, Jackson HL, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T cell therapy. *Molecular Therapy*.2016; 3: 16011.
23. Orlando EJ, Han X, Tribouley C, Wood PA, Leary RJ, Riester M, *et al.* Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR 19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine*. 2018 Oct 1; 24: 1504-6.
24. Rafiq S, Brentjens RJ. Tumors evading CARs -The chase is on. *Nature Medicine*. 2018 Oct; 24: 1492-8.
25. Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE *et al.* Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nature Medicine*. 2018 Oct; 24(10): 1499-1503.
26. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Hanafi LA, Finney O *et al.* Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR T cell therapy. *Blood Journal*.2016; 127: 2406-10.
27. Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH *et al.* Anti CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Journal Blood*. 2013 Feb 14; 121(7): 1165-74.
28. Yang F, Zhang J, Zhang X, Tian M, Wang J, Kang L, *et al.* Delayed remission following sequential infusion of humanized CD19 and CD22-modified CAR T cells in a patient with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia and a prior exposure to murine-derived CD19 directed CAR T cells. *Oncotargets and Therapy*. 2019 Mar 25; 12: 2187-91.
29. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S *et al.* CD22 CAR T cells induce remissions in CD19- CAR T Naïve and Resistant B-ALL. *Nature Medicine*. 2018 Jan; 24(1): 20-28.
30. Bonini C, Bondanza A, Perna SK, Kaneko S, Traversari C, Ciceri F, Bordignon C. The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach. *Molecular Therapy*. 2007 May 8; 15(7):1248-52.
31. Greco R, Oliveira G, Lupo Stanghellini MT, Vago L, Bondanza A, Peccatori J, *et al.* Improving the safety of cell therapy with the TK- suicide gene. *Frontiers in Pharmacology*. 2015 May 5; 6: 95.
32. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C *et al.* Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24(6):1160-70.
33. Budde LE, Berger C, Lin Y, Wang J, Li X, Frayo SE, *et al.* Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma. *PLoS One*. 2013 Dec 17; 8(12), article e82742.
34. Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, *et al.* A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Journal Blood*. 2014 Aug 21; 124(8): 1277-87.
35. Paszkiewicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, *et al.* Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016 Sep 8; 126(11): 4262-72.
36. Zang BL, Qin DY, Mo ZM, Li Y, Wei W, Wang YS, *et al.* CAR T cell therapy for solid tumors. *Science China Life Sciences*. 2016 Mar 9; 59(4): 340-48.
37. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T cell therapy for solid tumors. *Annual Review of Medicine*. 2016 Nov 17; 68: 139-52.
38. Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki E, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Research*. 2017 Dec 19; 5(2018): 46-58.

39. Ramos CA, Narala N, Vyas GM, Leen AM, Gerdemann U, Sturgis EM, et al. Human Papillomavirus Type 16 E7/E6- specific cytotoxic T lymphocytes for Adoptive Immunotherapy of HPV-associated malignances. *Journal Immunotherapy*. 2013 Jan; 36(1):66-76.
40. Sahin A, Sánchez C, Bullain S, Waterman P, Weissleder R, Carter BS. Development of third generation anti-EGFRvIII chimeric T cells and EGFRvIII- expressing artificial antigen presenting cells for adoptive cell therapy for glioma. *PLoS ONE*. 2018 Jul 5; 13(7): e0199414.
41. O' Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science Translational Medicine*. 2017 Jul 19; 9(399): eaaa0984.
42. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davis DM, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC 1: the evolution of Chimeric Antigen Receptor. *The Journal of Immunology*. 2008; 180: 4901-9.
43. Posey Jr. AD, Schwab RD, Boesteanu AC, Steentoft C, Mandel U, Engels B, et al. Engineered CAR T Cells targeting the cancer associated Tn- Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 control adenocarcinoma. *Immunity*. 2016 Jun 21; 44(6): 1444-54.
44. Lanitis E, Poussin M, Hagemann IS, Coukos G, Sandaltzopoulos R, Scholer N et al. Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor. *Molecular Therapy*. 2012 Mar; 20(3): 633-43.
45. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor RNA-m -engineered T cells induce antitumor activity in solid malignances. *Cancer Immunological Research*. 2014 Feb 1; 2(2): 112-20.
46. Morello A, Sadelain M, Adusumilli S. Mesothelin-targeted CARs: driving T cells to solid tumors. *Cancer Discovery*. 2016 Feb; 6(2): 133-46.
47. Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by targeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clinical Cancer Research*. 2011 Jul 15; 17(14): 4719-30.
48. Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM, et al. Enhanced Tumor trafficking of GD2 Chimeric Antigen Receptor T cells by expression of Chemokine Receptor CCR2b. *Journal Immunotherapy*. 2010 Oct; 33(8): 780-88.
49. Newick K, O' Brien S, Sun J, Kapoor V, Maceyko S, Lo A, et al. Augmentation of CAR T cell trafficking and antitumor efficacy by blocking protein kinase A (PKA) localization. *Cancer Immunological Research*. 2016 Jun; 4(6): 541-51.
50. Wang L-C S, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. Targeting Fibroblast Activation Protein in tumor stroma with Chimeric Antigen Receptor T cells can inhibit antitumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunological Research*. 2014 Feb; 2(2): 154-66.
51. Kakarla S, Chow KKh, Mata M, Shaffer DR, Song XT, Wu MF, et al. Antitumor effects of Chimeric Receptor engineered human T cells directed to tumor stroma. *Molecular Therapy*. 2013 Aug; 21(8): 1611-20.
52. Schuberth PC, Hagedorn C, Jensen SM, Gulati P, van den Broek M, Mischo A, et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma by Fibroblast Activation Protein-specific Re-directed T cells. *Journal of Translational Medicine*. 2013 Aug; 11:187.
53. Tran E, Chinnasamy D, Yu Z, Morgan RA, Lee CCr, Restifo RP, et al. Immune targeting of Fibroblast Activation Protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *Journal of Experimental Medicine*. 2013 Jun, 3; 210(6): 1125-35.
54. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T- Lymphocytes. *Nature Medicine*. 2015 May; 21(5); 524-29.
55. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present and future. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015 Sep 1; 129(9): 3384-91.

56. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, *et al.* A chimeric switch-receptor targeting PD-1 augments the efficacy of second generation CAR T cells in advanced solid tumors. *Cancer Research*. 2016 Mar 15; 76(6): 1578-90.
57. Li S, Siriwon N, Zhang X, Yang S, Jin T, He F, *et al.* Enhanced cancer immunotherapy by Chimeric Antigen Receptor-Modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors. *Clinical Cancer Research*. 2017 Sep 14; 23:6982-92.
58. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng J, Dimitrov DS, Jones DR, *et al.* Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *Journal of Clinical Investigation*. 2016 Aug 1; 126(8): 3130-44.
59. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: an overview of FDA- approved immune checkpoint inhibitors. *International Immunopharmacology*. 2018 Jul 2; 62(2018): 29-39.
60. Byrd TT, Fousek K, Pignata A, Szot C, Samaha H, Seaman S, *et al.* TEM8/ANTXR1-specific CAR T cells as a targeted therapy for triple-negative breast cancer. *Cancer Research*. 2018 Jan 15; 78(2): 489-500.
61. Song DG, Ye Q, Poussin M, Chacon JA, Figini M, Powell DJ Jr. Effective adoptive immunotherapy of triple-negative breast cancer by folate receptor-alpha redirected CAR T cells is influenced by surface antigen expression level. *Journal of Hematology & Oncology*. 2016 Jul 20; 9(1): 56.
62. Brown CE, Aguilar B, Starr R, Yang X, Chang W-C, Weng L, *et al.* Optimization of IL13R- α 2-Targeted Chimeric Antigen Receptor T cells for improved anti-tumor efficacy against glioblastoma. *Molecular Therapy*. 2018 Jan; 26(1): 31-44.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.