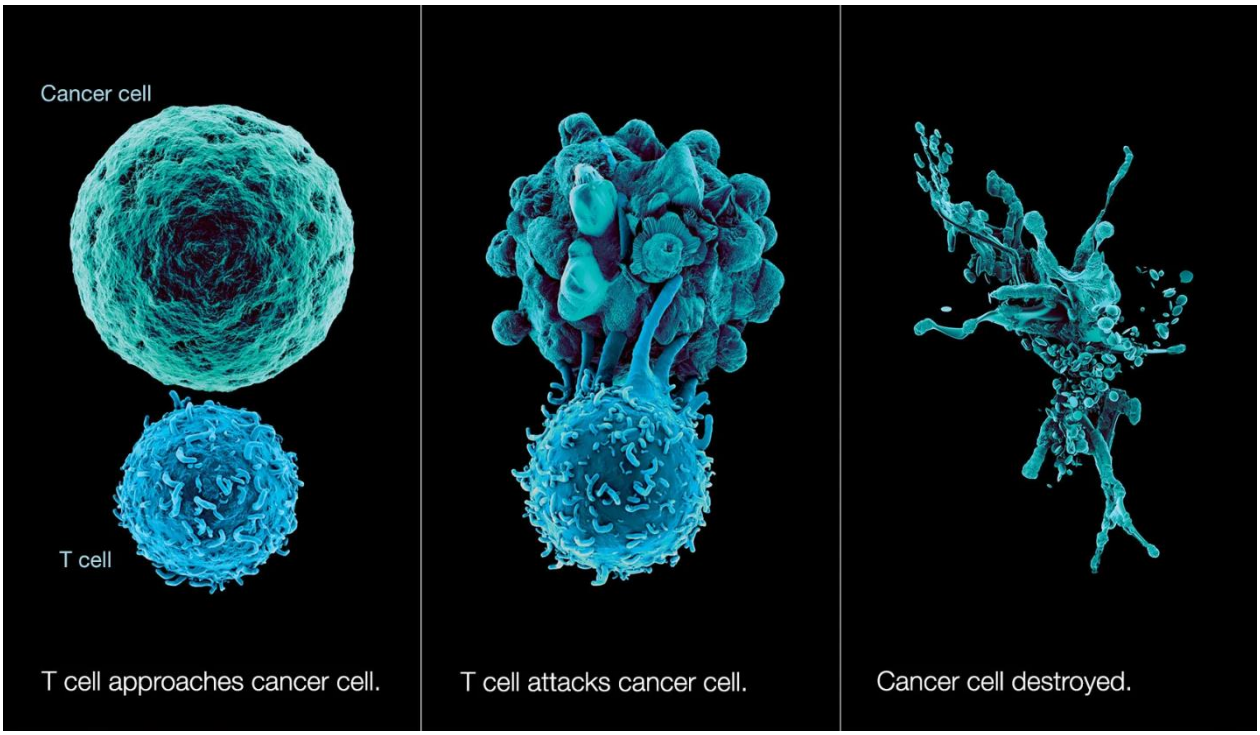
Desarrollo y optimización de una terapia CAR-T contra la leucemia mieloide aguda

David Sánchez Méndez

TRABAJO DE FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Ana Fernández Bravo. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. ana.fernandez@urv.cat

En cooperación con: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Supervisores: Hisse Martien Van Santen (hvansanten@cbm.csic.es) y Lydia Horndler Gil (lydia.horndler@cbm.csic.es). Departamento de Desarrollo y Función del Sistema Inmunitario.

Enero, 2023

Yo, "David Sánchez Méndez", con DNI "70830949B", soy conocedor de la guía de prevención de plagio de la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guía per a estudiants* (aprobada en julio de 2017) (http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

SANCHEZ MENDEZ DAVID - 70830949B

Firmado digitalmente por SANCHEZ MENDEZ DAVID - 70830949B
Fecha: 2023.01.08 22:47:45 +01'00'

Tarragona, 8 de Enero de 2023

Índice

Datos del centro 5

Resumen 6

1. Introducción 7

1.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA) 7

1.2 Inmunoterapia en el cáncer 8

1.3 Terapia con células CAR-T 8

1.4 Estructura del CAR 9

1.5 Perspectivas de la terapia con células CAR-T 12

1.6 KIR (Killer Cell Immunoglobuline-like receptor) 13

2. Hipótesis y Objetivos 15

3. Materiales y métodos 16

3.1 Cultivos celulares 16

3.2 Células primarias 16

3.3 Modelos animales 16

3.4 Clonaje de las construcciones quiméricas en lentivirus 17

3.5 Construcciones utilizadas 18

3.6 Expresión de las construcciones en células T 18

3.7 Análisis de expresión de las construcciones 20

3.8 Activación *in vitro* de células Jurkat 20

3.9 Ensayo de citotoxicidad *in vitro* 21

3.10 Ensayo de citotoxicidad *In vivo* 22

3.11 Análisis estadístico 22

4. Resultados 23

4.1 Análisis de la expresión de las construcciones 23

4.2 Ensayo de activación *in vitro* 25

4.3 Ensayo de citotoxicidad *In vitro* 26

4.4 Ensayo de citotoxicidad *in vivo* 29
4.5 Generación y expresión de las construcciones del KIR quiméricas..... 30
5. Discusión..... 31
5.1 Expresión de las construcciones 31
5.2 Efectividad del CAR Corto vs CAR Largo..... 32
5.3 Inhibición a traves del KIR2DL1..... 33
5.4 Generación de la proteína quimérica..... 33
6. Conclusión..... 34
7. Bibliografía 35
8. Agradecimientos..... 38
9. Autoevaluación..... 39

Datos del centro

El Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) es un centro de investigación mixto entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad autónoma de Madrid. Fue fundado en 1975 por el premio nobel Severo Ochoa de Albornoz donde junto a los grupos más relevantes de España en bioquímica y biología molecular.

En la actualidad es un centro multidisciplinar en el que son investigados desde las bases moleculares de procesos complejos como el mantenimiento de la estabilidad genómica en bacterias, hasta el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Los investigadores indagan en temas complejos cuyo estudio puede ser aplicado para realizar avances en el campo de la biotecnología y para el desarrollo de nuevos tratamientos en el ámbito clínico.

Esta investigación fue llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Hisse Martien Van Santen dedicado al estudio de los dominios del TCR, sus roles en la activación y diferenciación de células T y sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un tipo de leucemia caracterizada por la acumulación de precursores celulares. La LMA presenta unas altas tasas de mortalidad y a pesar de los esfuerzos realizados no se han podido desarrollar nuevos tratamientos. Resultados prometedores en ensayos clínicos utilizando el marcador CD33 abren la posibilidad de un nuevo avance en el campo, pero la expresión de este marcador en precursores sanos de la línea mieloide impide su uso debido a los elevados niveles de toxicidad.

En este proyecto evaluamos el uso de una terapia CAR-T anti-CD33 contra la LMA. Para evitar los efectos *on-target off-tumor* estudiamos la posibilidad de utilizar un receptor tipo KIR, proveniente de las células NK, como mecanismo inhibitorio.

Palabras clave: CAR, células CAR-T, KIR, CD33, Leucemia Mieloide Aguda

1. Introducción

1.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un tipo de leucemia caracterizada por la alteración de la producción de células hematopoyéticas. En la LMA la diferenciación celular es inhibida a la vez que es estimulada la proliferación, provocando la acumulación de precursores celulares, también conocidos como blastos.

Los blastos sustituyen al resto de células hematopoyéticas provocando una disminución del resto de tipos celulares (citopenias). La acumulación de células precursoras se produce primero en la médula ósea, luego se expande a la sangre y se disemina a otras partes del cuerpo, como al hígado o a los ganglios linfáticos.

La LMA es una enfermedad con un pronóstico variable y una alta mortalidad. Hoy en día, el 50 % de los pacientes muere dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico y, en el caso de las personas de edad avanzada, el 80 % muere dentro de los 2 años posteriores.(1)

Actualmente los tratamientos para la LMA se basan en el uso de quimioterapia en combinación normalmente de un trasplante de médula ósea. La dificultad para encontrar un donante de médula de ósea con un HLA (del inglés, human leukocyte antigen) compatible ha provocado que en algunos casos se deban utilizar donantes haploidenticos, obteniéndose resultados satisfactorios en el caso de la LMA. Hoy en día las donaciones de médula haploiedenticas para tratar la LMA suponen el tipo de trasplante más común en China, y el tercero más común en Europa. Aun así problemas como infecciones o recaídas siguen suponiendo un obstáculo a la hora de mejorar los resultados clínicos.(2)

En los últimos años se ha intentado explotar el antígeno CD33 para el desarrollo de nuevos tratamiento. Este marcador es expresado por parte de las células tumorales en la LMA y en otros tipos de leucemias linfoblásticas, sin embargo este marcador también es expresado por los precursores sanos de la línea mieloide. Las toxicidades derivadas de este efecto *on-target off-tumor* han causado el fracaso de varios ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales y conjugados.(3)

1.2 Inmunoterapia en el cáncer

En la inmunoterapia son utilizados distintos tipos de agentes para la activación o estimulación del sistema inmune con el fin de provocar la eliminación de células cancerosas. En los primeros tratamientos se administraba a los pacientes con IFN-γ (1986) y Il-2 (1992) recombinantes, lo que resultaba en mejoras significativas y duraderas de gran parte de los pacientes. Sin embargo, las altas dosis requeridas por el bajo tiempo de vida de los compuestos resultaba en graves efectos secundarios como hipercitoquenias o el síndrome de fuga capilar lo que causó el fracaso de numerosos ensayos clínicos. (4)

En 1997 con la aprobación del anticuerpo monoclonal Rituximab se abrió la posibilidad de una inmunoterapia más dirigida. Este anticuerpo es dirigido hacia CD20, un marcador expresado por las células B y al ser activado provoca induce el inicio de la apoptosis. Actualmente se están desarrollando nuevos usos para los anticuerpos monoclonales a través de los inhibidores de punto de control inmunitarios (immune checkpoint inhibitors). Los proteínas inmunomoduladoras más conocidas son las proteínas PD-1 y CTLA-4, las cuales provocan la inhibición de las funciones de las células T. Cuando impedimos que estas proteínas inhibitorias se activen, permitimos que las células T reconozcan y destruyan la célula tumoral.(4)

Uno de los enfoques que está ganando más importancia durante los últimos años es la modificación *ex vivo* de las células T de pacientes, generando una célula T capaz de reconocer antígenos específicos relevantes para la enfermedad, este proceso es denominado terapia de células adoptivas. El tipo de receptor expresado puede ser un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR), siendo este ultimo el que es más comúnmente utilizado y en el que nos centraremos en este estudio.

1.3 Terapia con células CAR-T

Los receptores de antígeno quiméricos o CAR (por sus siglas en inglés), son receptores recombinantes creados para reconocer un antígeno especifico, normalmente marcadores tumorales expresados en la superficie celular. Estos receptores combinan la parte intracelular de los receptores de las células T y la región de reconocimiento de antígenos de los receptores de las células B.(5)

En la terapia con células CAR-T primero los linfocitos T son extraídos de la sangre del paciente al que se le vaya a aplicar el tratamiento. A continuación, estas células T son transducidas con el CAR y son retransfundidas al paciente. Los linfocitos T que expresen el CAR serán redirigidos hacia las células cancerosas, logrando así una acción antitumoral.

La primera terapía con células CAR-T anti-CD19 fue aprobada en 2017 por la FDA y en 2018 por la EMA, para el tratamiento de la Leucemia linfoblástica aguda. Actualmente ya hay varios tratamientos aprobados con CAR y se estima que se están llevando a cabo más de 250 ensayos clínicos con células CAR-T en todo el mundo.(6)

Tabla 1. Tratamientos con células CAR-T aprobados por la FDA. Tabla modificada (7)

Nombre comercial	Objetivo	Fecha de aprobación	Enfermedades indicadas
Kymriah	CD19	ago-17	Leucemia linfoblástica aguda. Linfoma de células B grandes.
Yescarta	CD19	oct-17	Linfoma folicular. Linfoma de células B grandes.
Tecartus	CD19	jul-20	Linfoma de células del manto
Breyanzi	CD19	feb-21	Linfoma de células B grandes
Abecma	BCMA	mar-21	Mieloma múltiple

1.4 Estructura del CAR

La estructura de los CAR puede ser dividida en varias partes: una región extracelular encargada del reconocimiento de los antígenos, una región espaciadora, una región transmembrana y una región intracelular involucrada en la señalización.

1.4.1 Región de reconocimiento de antígenos

Para el reconocimiento del antígeno diversos tipos de moléculas son utilizados: scFv (fragmentos variables de cadena única) derivados de anticuerpos murinos, fragmentos Fab humanos seleccionados de librerías o ligandos endógenos que se unen a su receptor específico. Los scFv son los más utilizados gracias a su fácil generación a partir de anticuerpos monoclonales procedentes de roedores, sin embargo, tienen el inconveniente de que pueden provocar más inmunogenicidad que las otras opciones.(8)

Al contrario que los TCR los CAR no requieren de la presentación de antígenos por parte de MHC, lo que les permite reconocer antígenos que no han sido procesados previamente por las células.(7)

Un fragmento variable de cadena única o scFv, consiste en una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL) unidos a través de un enlazador flexible.(9)

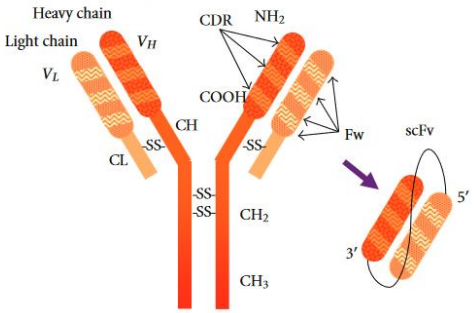


Figura 1. Representación de la estructura de un anticuerpo y de un fragmento variable de cadena única (scFv).(9)

1.4.2 Espaciador y región transmembrana

El espaciador es la región que une la zona transmembrana con la región de reconocimiento del antígeno. Dependiendo del caso puede tener mayor o menor longitud o contener una región que actúe a modo de bisagra para conferir al CAR mayor flexibilidad. Las secuencias aminoacídicas más usadas como espaciadores son aquellas derivadas de IgG1, IgG4, CD8 o CD28. (5)

Tanto la longitud como la flexibilidad del espaciador influyen en la actividad del CAR, pues dependiendo de la localización del epítopo el CAR necesitará una longitud u otra para acceder a él y evitar restricciones estéricas. Así aquellos epítopos más cercanos a la membrana celular serán reconocidos más fácilmente por aquellos CARs con un espaciador largo y los más lejanos a la membrana celular por los que tengan un espaciador corto, ayudando así a la formación de la sinapsis inmunológica. (10)

La zona transmembrana es la menos estudiada de todas aunque se ha visto que puede ser relevante en la transmisión de la señal. Ciertos estudios han observado que CAR que presentan la región transmembrana de CD3ζ pueden dimerizar entre sí e interactuar con las moléculas del TCR endógeno. La

dimerización produce un efecto positivo tanto en las interacciones con otras moléculas de señalización del TCR como en la activación de la célula.(11)

1.4.3 Dominios de señalización

La región intracelular, encargada de la señalización y la activación de la célula, es la más estudiada de todas y en la que se ha centrado la mayor parte de los esfuerzos para mejorar la actividad del CAR.

Las células T requieren de dos señales para activarse: la primera, la cual es dependiente del reconocimiento del antígeno, es producida por el dominio de estimulación CD3ζ del TCR (T cell receptor); la segunda señal es originada por los receptores de coestimulación que se expresan junto al TCR. Concretamente la primera señal se produce cuando se fosforilan los motivos ITAM (del inglés, Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) del domino CD3ζ , lo que induce el reclutamiento de la quinasa ZAP70 y el inicio de la cascada de señalización.

En el desarrollo de los CAR de primera generación se utilizó únicamente el dominio intracelular de CD3ζ , pero mostraron baja proliferación y persistencia durante los estudios *in vivo.* En los CAR de segunda generación para solucionar este problema se introdujo un dominio de coestimulación (normalmente 4-1BB (CD137) o CD28), mejorando significativamente los resultados respecto a los de primera generación, tanto en eficacia como en persistencia. Los CAR de tercera generación utilizan al mismo tiempo el dominio de coestimulación CD28 y el 4-1BB, sin embargo no se han hallado grandes diferencias con respecto a los de segunda generación, obteniendo en algunos casos una menor eficacia. (12)

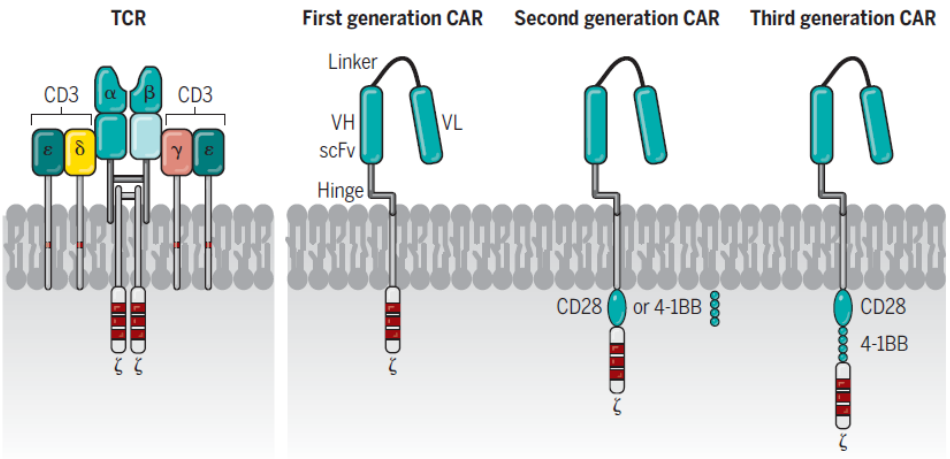


Figura 2. Comparación del receptor de las células T (TCR) con el complejo proteico CD3 y de las distintas generaciones de CAR. La primera generación solo contiene el dominio

CD3ζ ; en la segunda generación contienen un dominio de coestimulación CD28 o 4-1BB; y en la tercera generación tienen dos dominios de coestimulación. (6)

1.5 Perspectivas de la terapia con células CAR-T

La terapia con células CAR-T presenta varias limitaciones: las dificultades asociadas a la producción de la terapia, la baja efectividad en tumores sólidos y toxicidades causadas por un exceso de citoquinas proinflamatorias.

El elevado coste de producción y los tiempos de manufactura es uno de los grandes inconvenientes que presenta esta terapia. Además, pacientes que sufran inmunodeficiencias, bien por su patología o por los tratamientos derivados de ella, pueden tener dificultades para obtener un número suficiente de células para el tratamiento. Por eso se está desarrollando a traves de técnicas de edición genética células T “universales”, derivadas de pacientes sanos y que no produzcan reacciones de rechazo. Esto supondría un tratamiento más rápido, barato y accesible para un mayor número de pacientes. (6)

La células CAR-T cuando son activadas secretan mayoritariamente citoquinas proinflamatorias. Los altos niveles de inflamación pueden causar toxicidades neurológicas e incluso la muerte de algunos pacientes. Como alternativa se está estudiando el uso de células CAR-NK, puesto que las células NK secretan un perfil diferente de citoquinas como GM-CSF.

Otra de las ventajas de usar células NK son los mecanismos antitumorales que expresan todas las NK aparte del CAR, que pueden favorecer la eliminación de células cancerosas. Además, el bajo tiempo de vida de las células NK (2 semanas), puede ayudar a disminuir los efectos *on-target off-tumor*, pero puede resultar un inconveniente al requerir repetidas transfusiones durante un tratamiento.(7)

La efectividad de las terapias con células CAR-T ha sido mayoritariamente en canceres hematológicos presentando escasos resultados en tumores sólidos. Para superar esta barrera se están implementado mejoras como la adicción de receptores de quimiocinas para mejorar infiltración de las células CAR-T en el tumor. Una alternativa para mejorar la eficacia en tumores solidos es el uso de macrófagos, los cuales tienen mejores capacidad de infiltración y puede evitar parte de las inhibiciones causadas en los microambientes tumorales.(7)

1.6 KIR (Killer Cell Immunoglobuline-like receptor)

Las células NK (del inglés, *Natural Killer*) son un tipo de linfocitos pertenecientes a la respuesta inmune innata, cuya función es la destrucción de células cancerosas y células infectadas por virus. Las células NK son capaces de inhibir sus mecanismos efectores al interaccionar con las moléculas del HLA de clase 1 de las células objetivo. Los KIR (del inglés, killer cell immunoglobuline-like receptor) son el tipo de receptores más importantes de las células NK y están especializados en reconocer los distintos alotipos del HLA.

Los 4 ligandos conocidos de los KIR inhibitorios son 4 epítopos de HLA-A, HLA-B y HLA-C. En el caso del HLA C se han separado en dos alotipos (HLA-C1 y HLA-C2), basados en los dimorfismos de dos aminoácidos en el dominio α1 de la cadena pesada. La unión del KIR con el HLA se ve afectada por la variación de un aminoácido en una posición concreta porque el KIR forma puentes de hidrogeno en el punto de unión y un cambio puede alterar la afinidad y por tanto también repuesta inhibitoria. (13)

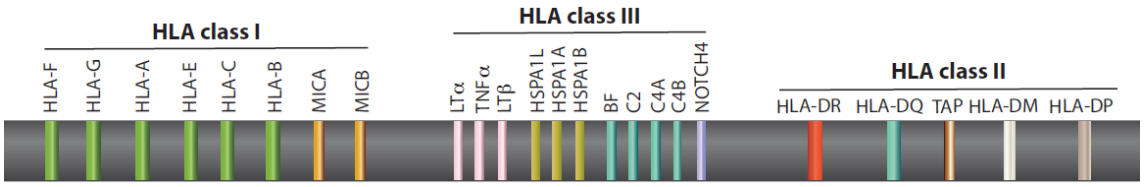


Figura 3. Mapa genético de la región que codifica para el complejo HLA, presente en el brazo corto del cromosoma 6. Dividido en 3 regiones dependiendo del tipo de HLA que codifiquen. Las moléculas del HLA de tipo 1 HLA-A, HLA-B y HLA-C presentan una gran variabilidad entre individuos con más de 3000 alotipos distintos caracterizados en la actualidad. (14)

Cuando una célula presenta unos niveles anormales de HLA , como pasa en el cáncer donde reducen su expresión para escapar de las células T, la inhibición causada por el KIR puede desaparecer y provocar la activación de las células NK. La inhibición de las células NK es causada por los motivos ITIM (del inglés, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) hallados en las regiones citoplasmáticas del KIR.(13)

El potencial inhibitorio de los KIR está siendo utilizado actualmente para disminuir los efectos *on-target off-tumor* de los CAR, basándose en el hecho de que normalmente los niveles de HLA son mucho menores la mayoría de las

células tumorales. Gracias a esto pueden aprovechar el efecto inhibitorio del KIR para evitar que las células sanas que expresan HLA sean afectadas por el tratamiento. Además, para potenciar la inhibición se ha generado un hibrido entre el KIR y la región citoplasmática de la proteína inhibitoria PD1. La proteína PD1 es expresada por las células T activadas para limitar una activación excesiva.(15)

A falta del descubrimiento de mejores biomarcadores que el CD33 para la Leucemia mieloide aguda, en este proyecto queremos explotar el poder inhibitorio del KIR para evitar los efectos *on-target off-tumor* y poder desarrollar un tratamiento viable para esta enfermedad.

Además, teniendo en cuenta la frecuencia con la que se realizan trasplantes de medula de donantes haploidenticos, podemos explotar la disparidad del fenotipo de HLA entre las células sanas del donante y las células tumorales del paciente. Así si el receptor del trasplante es homocigoto para el HLA-C2 y el donante es heterocigoto y expresa el HLA-C1 y el HLA-C2, podemos utilizar un KIR que reconozca el HLA-C1 (KIR2DL1) y se inhiba antes las células sanas, pero que no se inhiba ante las células tumorales.

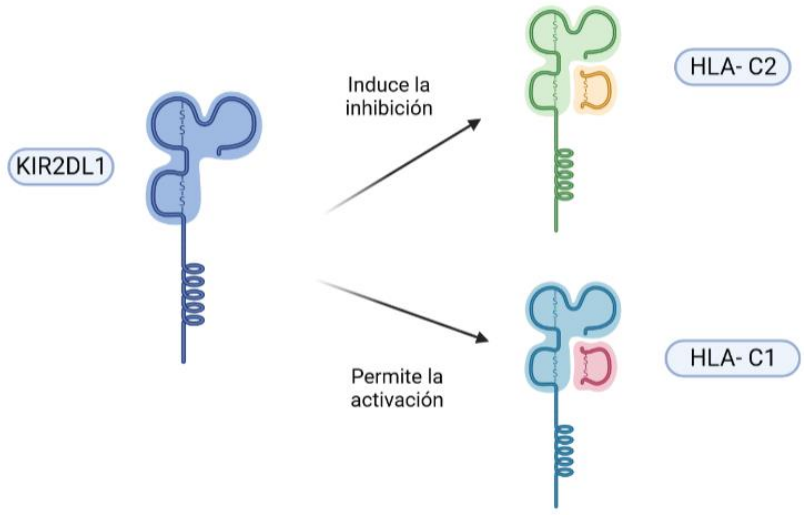


Figura 4. Representación de esquemática de los distintos efectos del KIR2DL1 sobre las células CAR-T al reaccionar con las variantes de HLA-C.

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La coexpresión del CAR anti-CD33 junto al KIR2DL1 puede evitar los efectos citotóxicos cuando interactúa con el HLA-C1 y la efectividad del CAR anti-CD33 puede mejorar al añadir un espaciador.

Objetivos

En este proyecto queremos evaluar el posible tratamiento de la LMA con un CAR anti-CD33. Con el fin de hallar una optimización para el CAR, caracterizamos dos variantes de un mismo CAR, una versión corta y una versión larga con un espaciador.

Estudiamos el posible uso del KIR2DL1 como mecanismo inhibitorio del CAR para evitar los efectos *on-target off-tumor* derivados de utilizar el biomarcador CD33 como diana. Además producimos una posible optimización del potencial inhibitorio del KIR generando un hibrido entre la región intracelular de PD1 y el KIR2DL1.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron: HEK293T usadas como células empaquetadoras de partículas virales; HL60 células leucémicas promielociticas humanas; TPHI, monocitos asilados de leucemia monocítica aguda y la línea de linfocitos T inmortalizados Jurkat. Aquellas células que crecen en suspensión (HL60,TPHI y Jurkat) fueron cultivadas en medio RPMI, mientras que las células empaquetadoras (HEK293T) fueron cultivadas en medio DMEM. Ambos medios fueron enriquecidos al 10% con suero fetal bovino L-glutamina 2 mM y el mix de antibióticos 100 U/ml de penicilina/estreptomicina.

Todas las células fueron manipuladas en condiciones estériles bajo una cabina de flujo laminar en un área con un nivel de bioseguridad P2 y cultivadas en un incubador de 37 °C con una humedad del 95%, y CO2 al 5%. Todas las líneas celulares fueron obtenidas del banco de células del laboratorio.

3.2 Células primarias

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) se obtuvieron de muestras de sangre de donantes anónimos del Banco de transfusiones de Madrid. Las células fueron purificadas utilizando un gradiente de Ficol (Sigma-Aldrich), de la cual asilamos la capa leucocitaria. Además, se purificaron por selección negativa los de linfocitos T marcando las poblaciones CD19 y CD20 positivas, utilizando anticuerpos de ratón mediante el sistema de Dynabeads Anti-Mouse IgG (ThermoFisher).

Los linfocitos T se cultivaron en medio RPMI enriquecido al 10 % con suero fetal bovino, de L-glutamina 2 mM y un mix de antibióticos 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Además las células fueron activadas para estimular su crecimiento a traves de Dynabeads CD3/CD28 (ThermoFisher) durante 5 días y mantenidas en cultivo con una suplementación Il-7 e Il-15 a 5U/mL.

3.3 Modelos animales

El modelo animal seleccionado para los experimentos de xenograft fueron ratones hembra de la cepa *Rag2*$^{-/-}$*Il2rg*$^{-/-}$ de entre 10 y 12 semanas. Este modelo fue seleccionado debido a su inmunodeficiencia de linfocitos B, T y NK

funcionales, disminuyendo el rechazo causado por el efecto injerto contra huésped.

Todas las manipulaciones de los ratones fueron realizadas en un ambiente estéril en un área con un nivel de bioseguridad P2 y siguiendo la normativa vigente de bienestar animal.

3.4 Clonaje de las construcciones quiméricas en lentivirus

Para producir el plásmido con el KIR2DL1 quimérico con la región intracelular de PD1 utilizamos la técnica ensamblaje de GIBSON, una técnica de clonación que no requiere enzimas de restricción. Primero generamos mediante PCR unos extremos complementarios entre el fragmento de la región intracelular PD1 y el plásmido que contiene el KIR2DL1 sin su región intracelular. El diseño de los primers para generar los extremos complementarios óptimos es realizado a través de la página web *NEBuilder.* Una vez producidos los fragmentos con los extremos complementarios llevamos a cabo el ensamblaje empleando el NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NewEngland BioLabs).

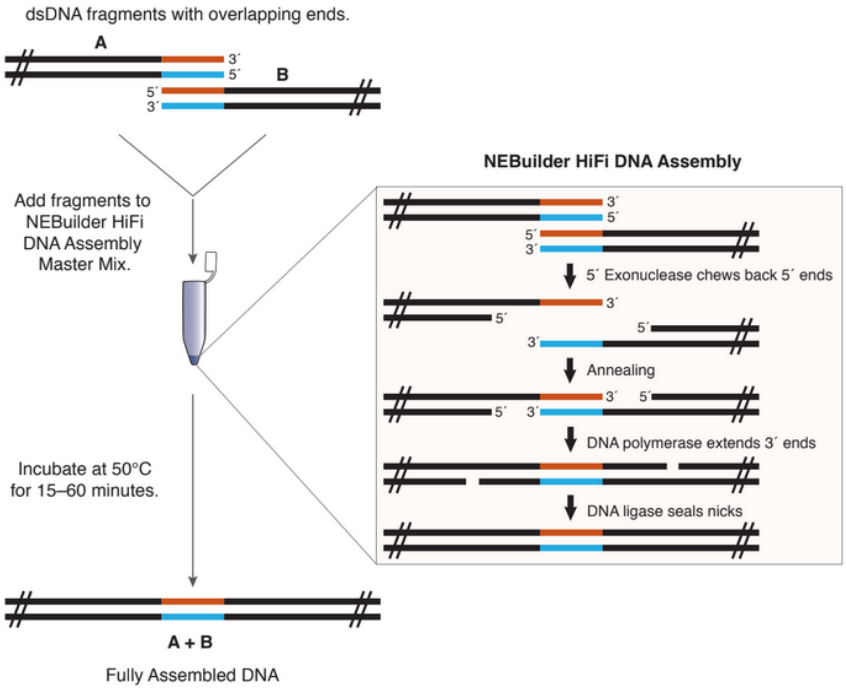


Figura 5. Mecanismo de acción del método de ensamblaje de GIBSON. Figura obtenida del manual de NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NewEngland BioLabs).

3.5 Construcciones utilizadas

El CAR utilizado contra CD33 es un CAR de segunda generación compuesto por un scFV derivado de un anticuerpo monoclonal murino, la región bisagra de IgG4, la región transmembrana de CD28, el dominio intracelular de señalización de CD3ζ y el dominio de coestimulación 4-1BB. En el caso de la variante denominada, CAR larga empleamos como espaciador las regiones CH2-CH3 de IgG4. Utilizamos además el KIR2DL1 y su quimera con la región intracelular de PD1, ambos expresados junto al CAR corto o al CAR largo.

Todas las variantes contienen la proteína tEGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado) como marcador de la expresión del CAR para su análisis mediante citometría. Entre las construcciones del CAR, el KIR y el tEGFR usamos los péptidos de autoescisión P2A y T2A para producir 3 proteínas separadas.

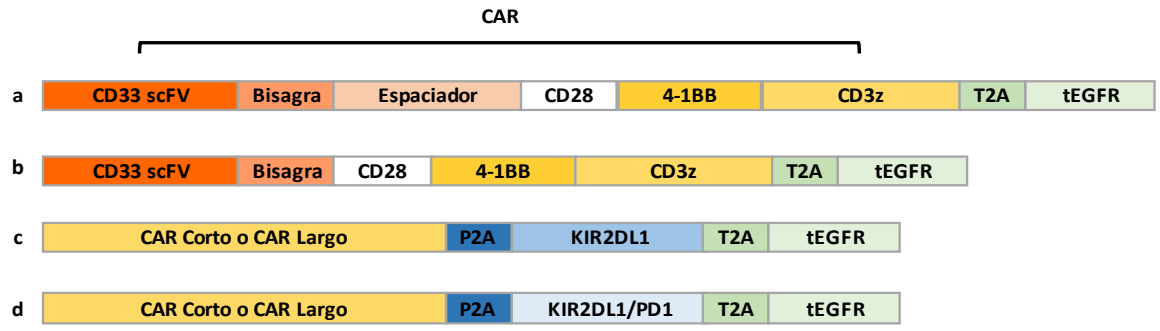


Figura 6. Representación esquemática de las distintas construcciones utilizadas: a) CAR largo b) CAR corto c) CAR + KIR2DL1 original d) CAR + KIR2DL1 quimérico con la región intracelular de PD1

3.6 Expresión de las construcciones en células T

Para la expresión de nuestras construcciones en células primarias y en Jurkat realizamos una transducción con lentivirus, utilizando un plásmido de expresión estable.

3.6.1 Transformación de los plásmidos

Con el fin de producir los diferentes plásmidos bacterias competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) son transformadas mediante choque térmico. El plásmido contiene el gen de resistencia a la ampicilina, por lo que seleccionamos las colonias transformadas exitosamente cultivándolas en placas de agar LB suplementada con ampicilina. Posteriormente son cultivadas en 500

mL de LB ampicilina y extraemos los plásmidos de interés utilizando el kit de Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

3.6.2 Generación de las partículas virales

Para la producción de los lentivirus utilizados para la transducción, las células empaquetadoras HEK293T son transfectadas de manera transitoria mediante polímeros catiónicos (jetPEI®).

El medio de las células empaquetadoras es renovado a las 24 horas de la transfección y es recogido a las 48 y 72 horas. Posteriormente se concentran las partículas virales mediante ultracentrifugación a 30000 rpm durante 3 horas y se almacenan a -80°C.

3.6.3 Transducción

A fin de transducir las células T añadimos las partículas virales al medio de cultivo y centrifugamos durante 1 hora a 2100 rpm. En el caso de transducir células Jurkat suplementamos el medio con Polybrene® (8µg/mL), un polímero catiónico, para mejorar la eficiencia de la transducción. Cuando trabajamos con células primarias no suplementamos con Polybrene debido a su toxicidad.

Para obtener poblaciones de células Jurkat totalmente transducidas utilizamos la técnica de *cell-sorting* usando citometría de flujo, separando las células transducidas mediante un marcaje anti-tEGFR.

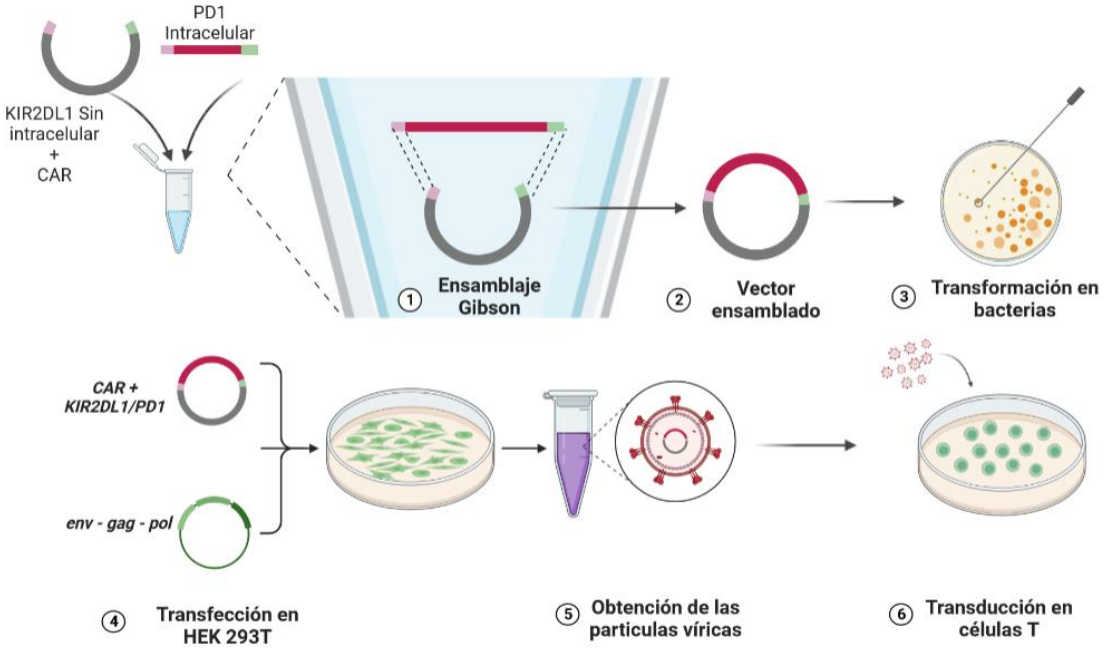


Figura 7. Esquema representativo del proceso de generación de la proteína quimérica y su expresión en células T. Figura creada utilizando Biorender.

3.7 Análisis de expresión de las construcciones

Comprobamos la correcta expresión de CAR mediante citometría de flujo, tiñendo extracelularmente células Jurkat con nuestra construcción con anticuerpos anti-tEGFR, anti-Fab y anti-CD158a (KIR2DL1) conjugados con marcadores fluorescentes. La tinción con anticuerpos fue realizada en hielo o a 4°C utilizando buffer de tinción PBS + 1% BSA + 0,02% azida en una dilución 1:200.

3.7.1 Citometría de flujo

Las células fueron caracterizadas mediante citometría de flujo utilizando los citómetros FACSCanto II o FACSCantoA (Becton Dickinson) y utilizando el software FlowJo 7.0 para analizar los datos resultantes.

3.7.2 Western Blot

Comprobamos el tamaño de los constructos mediante un Western Blot. Para ello lisamos 3 millones de células con cada una de nuestras variantes con 500µL del buffer de lisis Brij96 al 0,3% a 4°C. Después de una incubación de 45 minutos, los lisados son centrifugados durante 15 minutos a Vmax en una centrífuga de sobre mesa a 4°C.

El sobrenadante resultante es separado mediante geles de acrilamida al 10% en condiciones no reductoras (para analizar su dimerización) o reductoras (para la comprobación del tamaño del CAR), usando como agente reductor dithiothreitol (DTT) en el caso de que usemos condiciones reductoras. La transferencia es realizada en membranas de celulosa que son bloqueadas con BSA y posteriormente incubadas con un anticuerpo primario anti-CD3ζ de conejo y un anticuerpo secundario quimioluminiscente.

3.8 Activación *in vitro* de células Jurkat

Para medir la activación *in vivo* de células Jurkat transducidas con las distintas construcciones del CAR analizamos la producción extracelular de IL-2. Para ello cocultivamos 100.000 células de HL60 y 100.000 de Jurkat transducidas en una P96 y las coestimulamos con CD28 1 µg/mL. Tras incubarlo 24 horas el medio de cultivo es recogido y analizado mediante un ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

3.9 Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Para estudiar la citotoxicidad de las diferentes construcciones de CAR y KIR empleamos un ensayo basado en el uso de la enzima luciferasa, la cual en presencia de luciferina y ATP cataliza una reacción quimioluminiscente. Cuando las células diana mueren, no producen ATP por lo que la reacción de la luciferasa no puede llevarse a cabo y observaremos una menor emisión de luz.

Como células efectoras empleamos linfocitos T aislados de PBL transducidas con las construcciones del CAR corto, CAR largo y el KIR2DL1 con el CAR largo. Como diana utilizamos células HL60 que expresan el CD33 y HLA-C2, que es reconocido por nuestro KIR; y células TPH1 que expresan CD33 y HLA-C1, el cual no es reconocido por el KIR2DL1. Ambas líneas celulares sintetizan la enzima luciferasa, por lo que suplementamos el medio con D-Luciferina de luciérnaga 75 µg/mL para que se produzca la reacción.

De esta manera cocultivamos 10 mil células diana frente a diversos ratios de células efectoras 1:1, 1:3 y 1:9 (Diana : Efectoras) y medimos la luminiscencia a diversos intervalos de tiempo. Además recogemos el medio a las 48 horas, tras acabar el ensayo, para poder analizar la producción de Il-2.

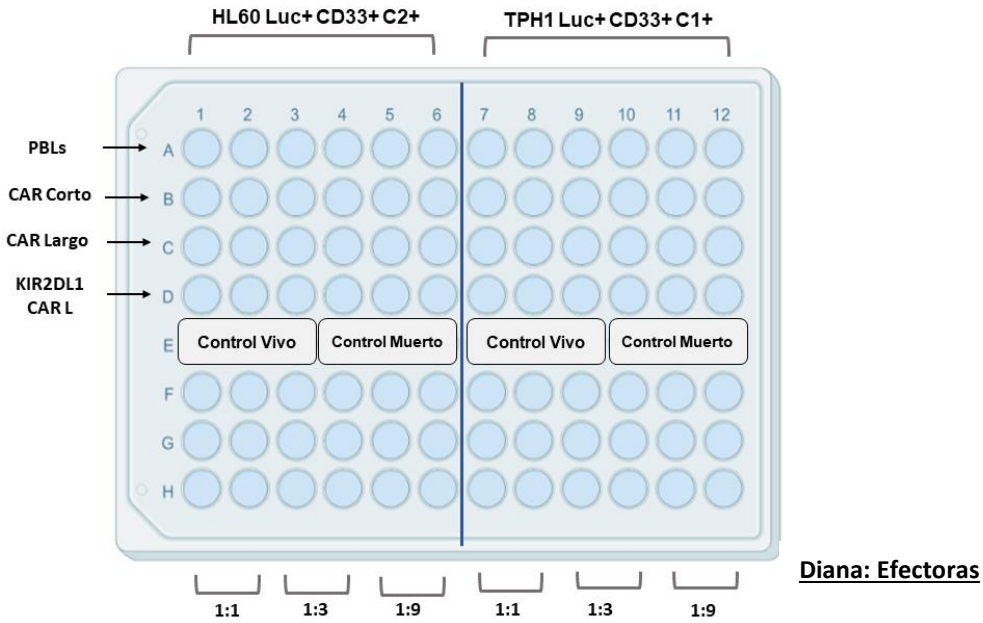


Figura 8. Esquema representativo del ensayo, realizado en una placa de 92 pocillos de fondo en U. En las filas variamos el tipo de CAR utilizado y en las columnas el ratio de células diana y efectoras. Empleamos células efectoras con las variantes del CAR largo y corto y el KIR2DL1 con la variante del CAR Largo. Como células diana usamos células CD33+, luciferasa+ con los tipos de HLA C-2 (HL60) y C-1 (TPH1). Además, realizamos un control con solo células objetivo vivas y otro con células objetivo muertas (suplementando el medio con el detergente Triton-X 100 (Thermo Fisher)).

3.10 Ensayo de citotoxicidad *In vivo*

Con el fin de observar la eficiencia de las variantes del CAR corto y largo *in vivo*, inducimos la leucemia a los ratones inyectándoles por vía intravenosa 1 millón de células de la línea celular HL60, la cual expresa la enzima luciferasa de luciérnaga.

Tres días después, cuando la leucemia se ha implantado, inoculamos 5 millones de células primarias transducidas con las variantes del CAR largo y el CAR corto. Monitorizamos su peso y a partir del décimo día medimos la luminiscencia de los ratones tras administrarles luciferina por vía intraperitoneal utilizando el equipo IVIS Spectrum .(15)

3.11 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando GraphPad PRISM 7.0. Realizamos análisis ANOVAS de una vía y de dos vías para analizar la significancia de los resultados. Consideramos resultados estadísticamente significativos si $p<0,05$.

4. Resultados

4.1 Análisis de la expresión de las construcciones

Mediante citometría de flujo evaluamos la expresión de las construcciones del CAR Corto y el CAR Largo, ambos con y sin el KIR2DL1, expresados en células Jurkat. Evaluamos los niveles de expresión utilizando un marcaje anti-Fab, anti-tEGFR y anti-KIRD2L1.

Al analizar la expresión del CAR podemos observar que las 4 construcciones expresan su CAR correspondiente. En todos los casos vemos una expresión del CAR, pero en las construcciones que además presentan el KIR los niveles de expresión son menores sobre todo en la construcción del KIR más el CAR Corto.

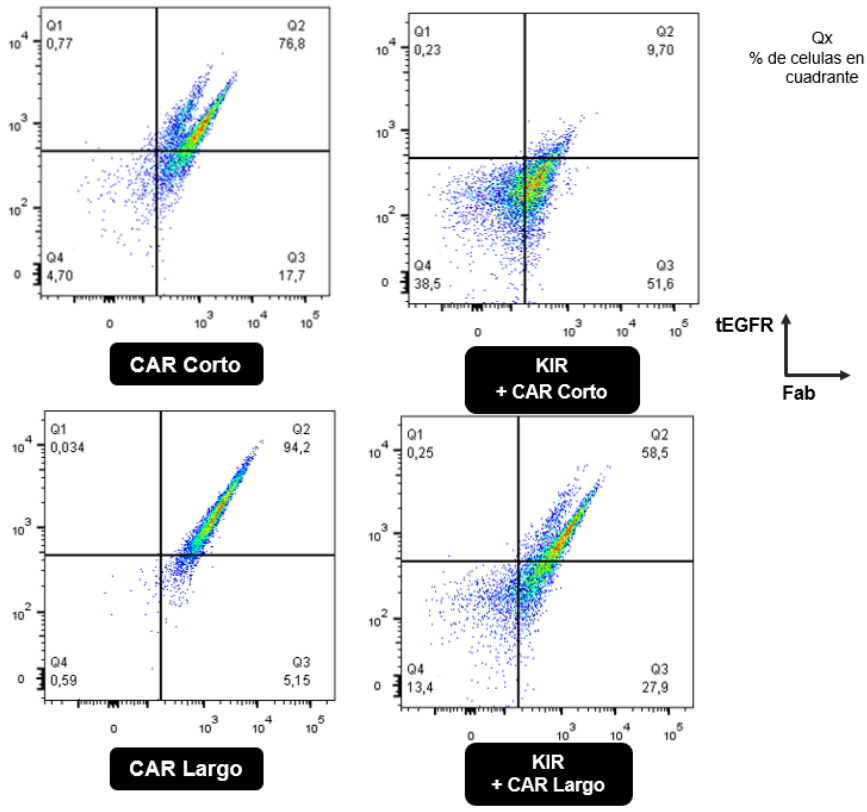


Figura 9. Niveles de expresión del CAR (eje x) y de tEGFR (eje y) de las construcciones del CAR Corto, el CAR Corto más el KIR2DL1, el CAR Largo y el CAR Largo más el KIR2DL1 expresadas en Jurkat. Poblaciones celulares distribuidas en cuatro cuadrantes: Q1= tEGFR positivas, Q2 = CAR positivas y tEGFR positivas, Q3= CAR positivas, Q4 = Ninguna expresión de la construcción. Mayor cercanía al origen de los ejes indica menor intensidad de expresión.

Como observamos en la Figura 10, el KIR2DL1 es expresado satisfactoriamente en la membrana tanto si está expresado con el CAR Largo como con el CAR Corto. Vemos que las poblaciones celulares del CAR Corto + KIR tienen unos menores niveles de tEGFR y más heterogéneos que en el caso del KIR + CAR Largo, pero los niveles de expresión del KIR son similares.

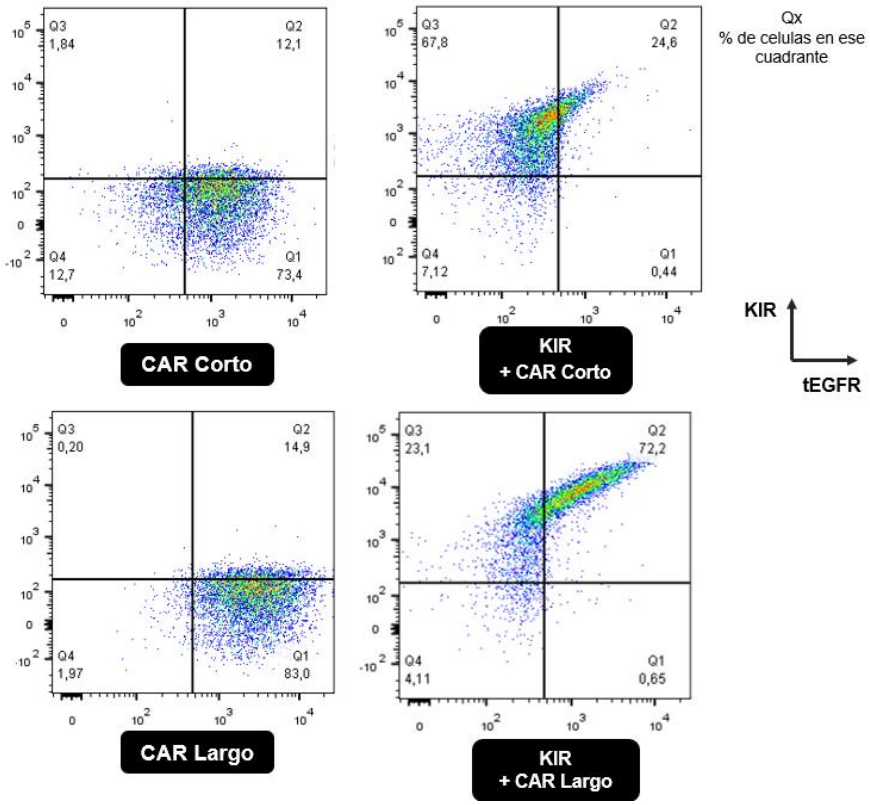


Figura 10. Niveles de expresión del KIR2DL1 (eje y) y de tEGFR (eje x) de las construcciones del CAR Corto, el CAR Corto más el KIR2DL1, el CAR Largo y el CAR Largo más el KIR2DL1 expresadas en Jurkat. Poblaciones celulares distribuidas en cuatro cuadrantes: Q1= tEGFR positivas, Q2= KIR2DL1 positivas y tEGFR positivas, Q3= KIR2DL1 positivas, Q4 = Ninguna expresión de la construcción. Mayor cercanía al origen de los ejes indica menor intensidad de expresión.

El hecho de que tengamos poblaciones con distintos niveles de tEGFR indican una mal calidad de transducción y menores niveles de tEGFR significan una menor expresión de nuestra construcción.

Pudimos comprobar que el tamaño de nuestro CAR es el esperado tras realizar el WesternBlot. Como observamos en la figura 11 en el caso de las construcciones que contienen el CAR corto observamos una banda a la altura de 55kDa y las del CAR largo alrededor de 78 kDA.

En condiciones no reductoras no pudimos observar ninguna banda correspondiente al CAR solo la correspondiente al CD3ζ de los TCR endógenos de las células Jurkat.

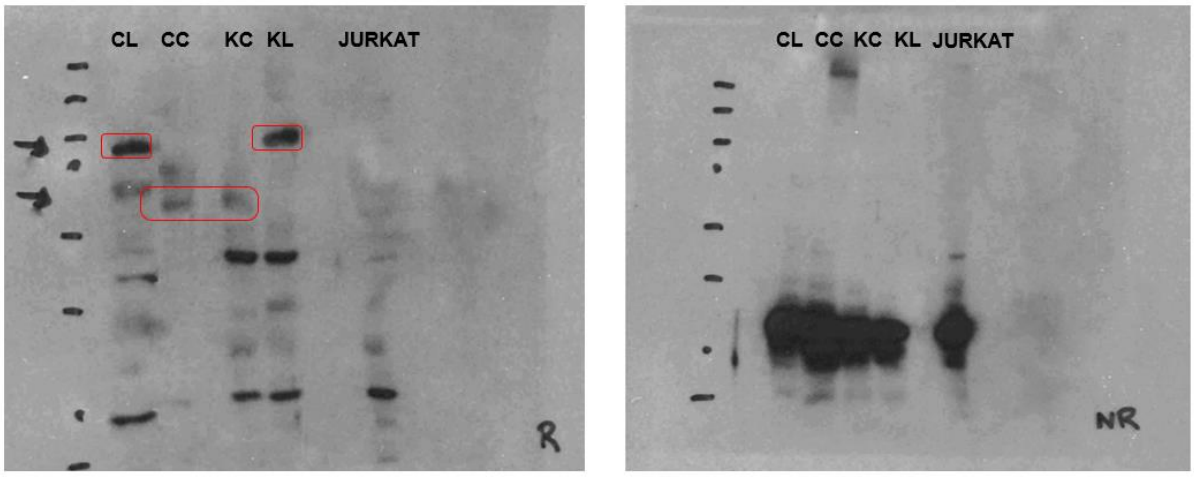


Figura 11. Revelado obtenido del Western Blot en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha) del lisado de células Jurkat sin transducir, células con el CAR corto (CC) y con el KIR (KC) y células con el CAR Largo (CL) y el KIR (KL) . Señaladas las bandas correspondientes tanto al CAR largo (entre las bandas del marcador 75 y 100 kDA) como del CAR Corto (entre las bandas del marcador de 50 y 75kDA).

4.2 Ensayo de activación *in vitro*

Tras cocultivar por 24 horas las células Jurkat con las construcciones del CAR corto y el CAR largo junto con células HL60 que expresan el antígeno diana de nuestro CAR , analizamos los niveles de activación de cada construcción según la síntesis de IL-2. Así, observamos que ambos grupos se activan con células que expresan CD33 . también podemos observar que los niveles de IL-2 del grupo con el CAR Largo son significativamente mayores que los del grupo con el CAR corto.

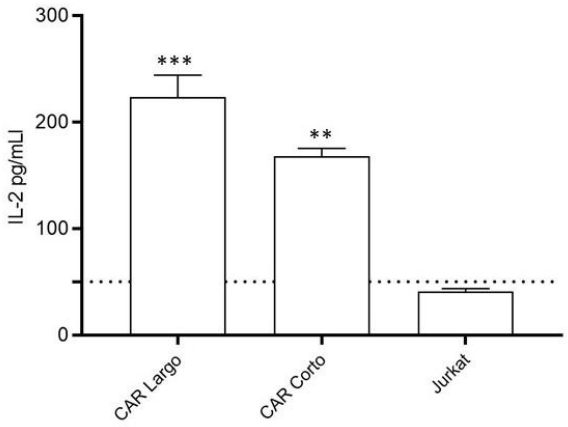


Figura 12. Niveles de Il-2 en células Jurkat expresando el CAR largo, el CAR Corto y células sin transducir como control.

4.3 Ensayo de citotoxicidad *In vitro*

Para estudiar la citotoxicidad utilizamos los linfocitos T transducidos con las construcciones del CAR largo, el CAR corto y el KIR2DL1 con el CAR largo, en tres ratios 1:1, 1:3 y 1:9 (Diana : Efectoras), pero a la hora de preparar el experimento no se pudieron obtener suficientes células para preparar los 3 ratios del grupo del CAR corto asi que solo se realizó el ratio 1:1 de este grupo.

Preparamos un control con solo células diana (HL60, TPH1) y un control con PBL sin transducir como comprobación de los efectos citotóxicos aloespecificos que puedan ocurrir al cocultivar células de dos orígenes diferentes. Para analizar el número de células vivas leímos la emisión de las placas a los tiempos 16, 24, 36 y 48 horas (menor emisión = menos células vivas).

Al analizar los datos obtenidos observamos que no hay ninguna diferencia significativa entre los controles con PBL sin transducir y el control de solo células objetivo, descartando los efectos aloreactivos (Figura 13).

A las 16 horas observamos que la emisión de luz por parte del grupo con el CAR Corto es cercana a cero, significando que no quedan apenas células vivas. Podemos ver que la eficiencia del CAR Largo en el ratio 1:1 es mucho menor en comparación con la del CAR Corto, pues no es hasta el ratio 1:9 cuando el CAR Largo muestra un nivel de citotoxicidad parecido al del CAR corto ratio 1:1 (Figura 13) .

Podemos observar además la acción inhibitoria del KIR en las HL60, las cuales poseen el HLA-C2 que es reconocido por el KIR2DL1. De este modo observamos una diferencia sustancial entre el grupo con el CAR Largo y los que tienen el KIR, pues la citotoxicidad es tan baja que en los ratios 1:1 y 1:3 no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo del KIR y el control de PBLs. Sin embargo en el ratio 1:9 si observamos citotoxicidad aunque más reducida que la del mismo ratio del CAR largo.

En el caso de las células TPH1, el nivel de inhibición, aunque es menor, todavía persiste pues podemos observar una menor citotoxicidad en el grupo con el KIR en los ratios 1:1 y 1:3 (Figura 13).

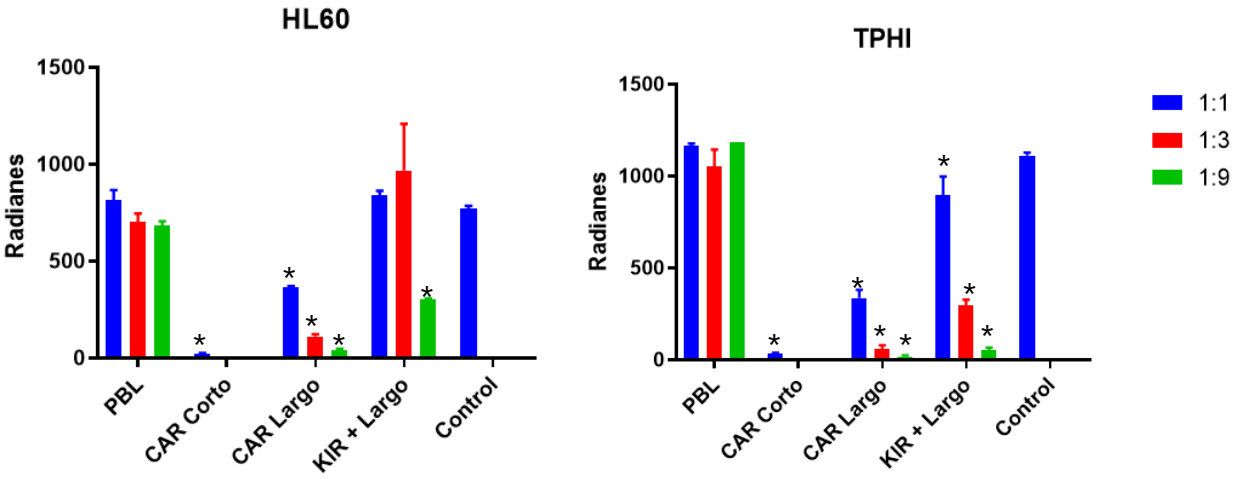
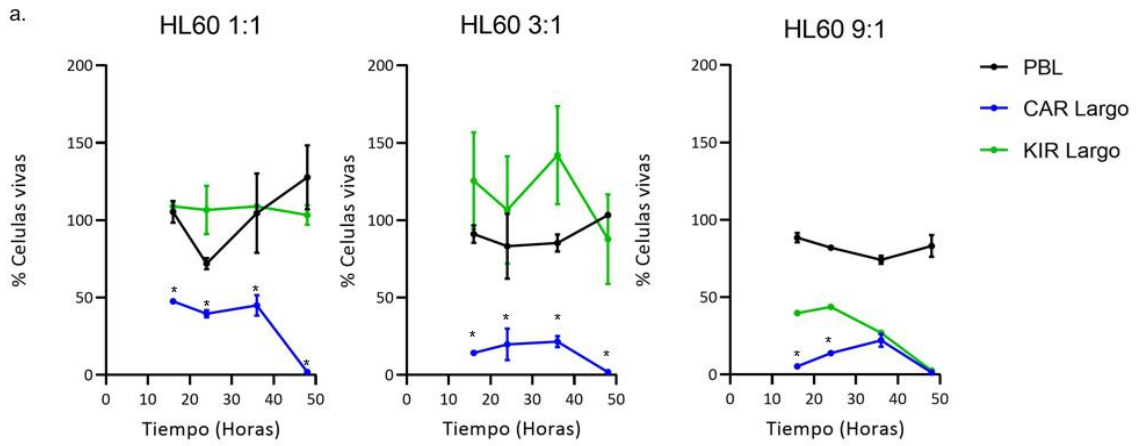


*Figura 13. Luminiscencias a las 16 horas de cocultivo de las construcciones del CAR corto, el CAR largo y el KIR2DL1 con el CAR largo con las células HL60 o las TPH1. Marcados con un * todos aquellos grupos con diferencias estadísticamente significativas con el control de PBL. Menor emisión de luz es equivalente a un menor número de células y a un efecto citotóxico más grande por parte de las células efectoras.*

Al comparar los datos obtenidos a las diferentes horas, observamos que el efecto inhibitorio en el caso de las HL60 en los ratios 1:1 y 1:3 es total y perdura hasta el final del experimento. En cambio, en el ratio 1:9 en las primeras horas vemos una inhibición parcial, pero a las 36 horas ya no se observa ninguna diferencia con el grupo del CAR largo (Figura 14.a).

Similares resultados obtenemos con las células TPH1, con las cuales en el ratio 1:1 observamos una inhibición parcial durante las 48 horas, en el ratio 1:3 una inhibición más reducida hasta las 36 horas y en el ratio 1:9 no apreciamos ninguna inhibición (Figura 14.b).



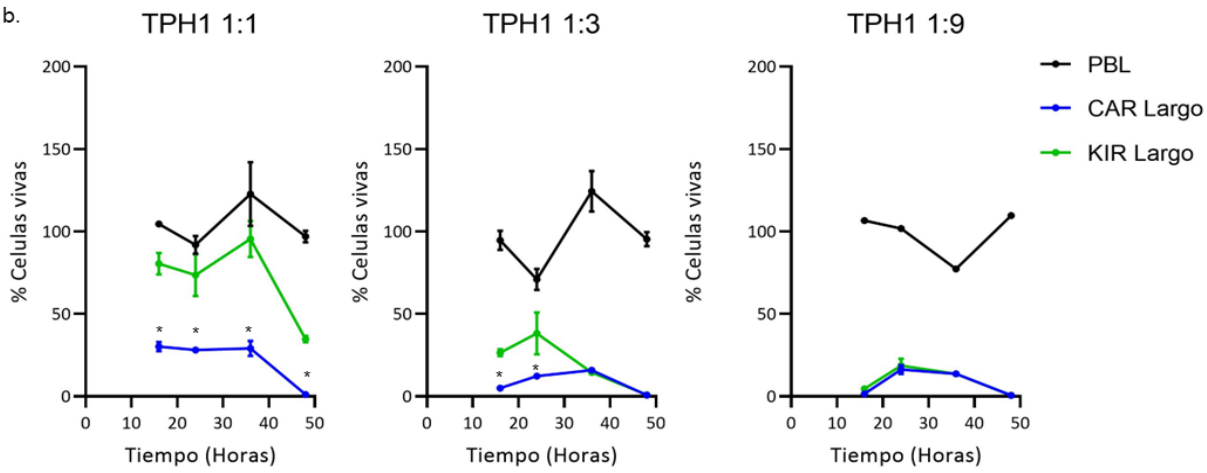


Figura 14. Porcentaje de células vivas en los ratios 1:1, 1:3 y 1:9 de los cocultitivos de PBLs sin transducir, PBLs con el CAR largo y PBLs con el KIR2DL1 más el CAR largo (denominados KIR largo) con a) células HL60 b) células TPH1. Porcentaje de células vivas a las 16, 24, 36 y 48 horas. Calculamos el porcentaje a partir de las luminiscencias del control y la luminiscencia de cada muestra (emisión de la muestra/emisión del control x 100).

Analizando mediante un ELISA los medios de cultivo a las 48 horas en el cocultivo con células HL60, observamos que el único grupo en el que se detecta Interleuquina 2 es el ratio 1:1 del CAR Largo (Figura 15).

En el caso de las TPH1 estamos ante una situación similar, sin embargo, en este caso podemos observar cómo los niveles de IL-2 en el ratio 1:1 del grupo con el KIR son también más elevados que en las demás muestras. Al igual que en el cocultivo con HL60, el grupo que tiene el CAR Largo en el ratio 1:1 tiene unos niveles superiores de IL-2 que los demás (Figura 15).

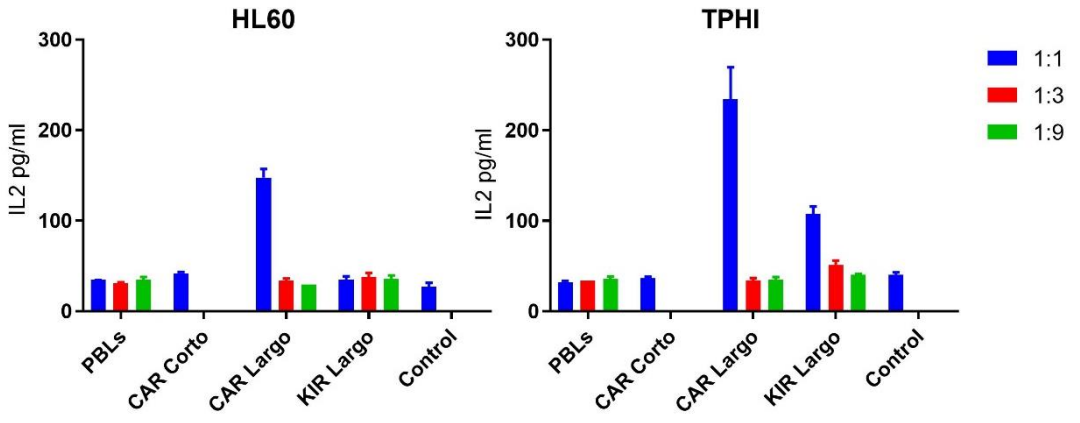


Figura 15 . Niveles de Interleuquina-2 a las 48 horas tras realizar un ELISA del medio de cocultivo de las distintas construcciones del CAR con HL60 o TPH1. KIR Largo = KIR2DL1 más el CAR largo

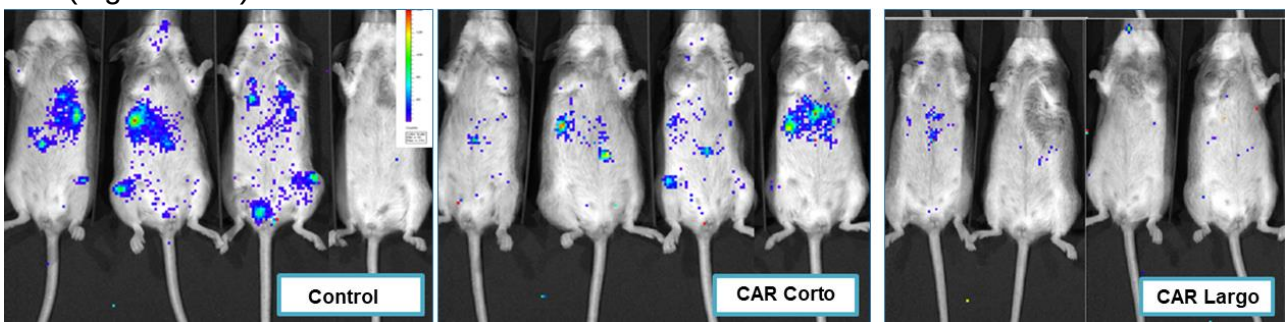
4.4 Ensayo de citotoxicidad *in vivo*

Para el estudio un *in vivo* utilizamos un total de 12 ratones divididos en 3 grupos: un grupo control tratados con PBLs sin transducir, un grupo tratado con PBLs con el CAR Corto y otro grupo con el CAR Largo (ambos con los mismo niveles de transducción). A todos ellos se les indujo una leucemia utilizando células HL60 LUC+ 3 días antes de iniciar el tratamiento con los CAR.

A partir del día 10 pudimos medir la luminiscencia de los ratones a los 10 minutos de ser administrados con luciferina por vía intraperitoneal. En las medidas anteriores al día 10 no se detectó ninguna emisión de luz medible. Evaluamos los niveles de luminiscencia hasta el día 24, a partir de este día el estado de salud de los ratones empeora considerablemente llegando al punto final del experimento.

Comparando los niveles de luminiscencia de los ratones obtenemos que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y aquellos tratados con células CAR-T. Además de los dos tratamientos observamos que el que produce una diferencia más significativa es el del grupo tratado con el CAR largo (Figura 16.b).

a.



b.

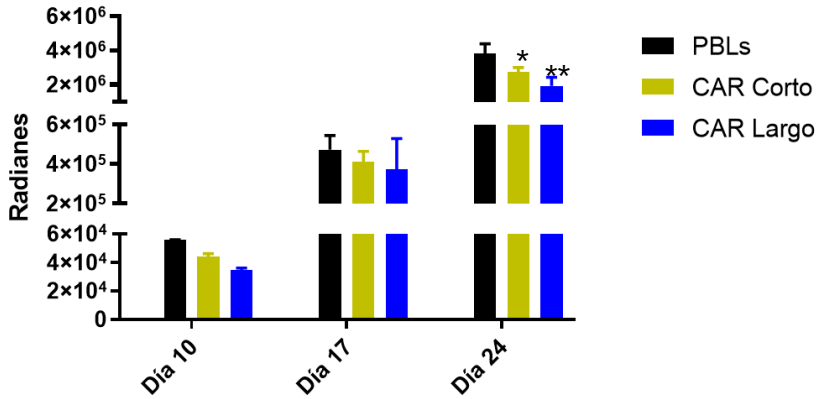


*Figura 16. a) Fotografías de las luminiscencias obtenidas el día 10 de los 3 grupos. Colores más cálidos implican mayor emisión. b) Emisiones detectadas a los 10, 17 y 24 días. Significancias: * = p< 0,05. ** = p < 0,01*

4.5 Generación y expresión de las construcciones del KIR quiméricas

Tras realizar la técnica de ensamblaje GIBSON y la comprobación del correcto ensamblaje mediante secuenciación, generamos las partículas virales para la transducción en células T.

Obtenemos así un plásmido con el KI2DL1 pero con la parte intracelular de la proteína PD1 en las construcciones con el CAR largo y el CAR corto. Transducimos células Jurkat con esta construcción y las teñimos con anti-tEGFR y anti-CD158a para comprobar si la proteína quimérica del KIR se expresa correctamente .

Como observamos en la Figura 17, la proteína quimérica se expresa satisfactoriamente en membrana tanto en la construcción con el CAR largo como en la construcción con el CAR corto. Obtenemos unos niveles bajos de tEGFR debido a una baja transducción.

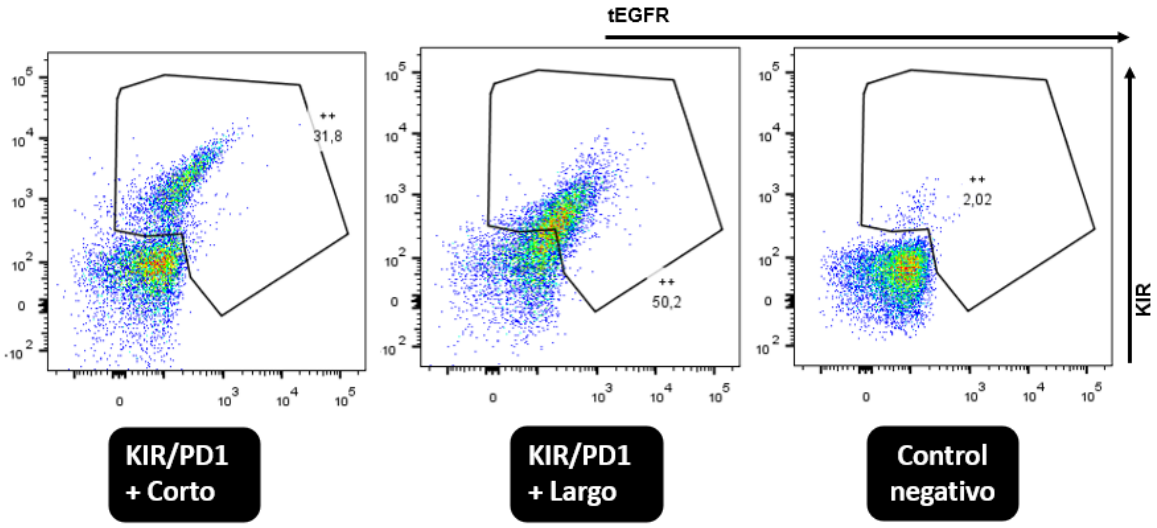


Figura 17. Niveles de expresión de la proteína quimérica KIR2DL1/PD1 por parte de células Jurkat. Eje x = niveles de tEGFR. Eje = Niveles del KIR. Utilizamos como control negativo células Jurkat sin transducir .

5. Discusión

5.1 Expresión de las construcciones

Con los estudios de expresión de las diferentes construcciones hemos podido observar que todos los CAR y los KIR son capaces de expresarse satisfactoriamente y llegar a la membrana celular, sin embargo, advertimos grandes diferencias de niveles de expresión entre construcciones. Estas diferencias pueden ser debido a varios factores:

- La eficiencia de transducción con lentivirus es muy variable dependiendo del lote, ya que cuando las células empaquetadoras no son transfectadas correctamente, la eficacia baja sustancialmente. Podríamos solucionarlo utilizando otros métodos de transducción libres de virus como el sistema de transposones *Sleeping Beauty*. Este sistema simplificaría el proceso de manufactura, mejoraría el perfil de bioseguridad y facilitaría su implementación en ámbito clínicos (16)

- Las construcciones más grandes (aquellas que contienen el KIR), tienen unos niveles de expresión más bajos. Esto puede asociarse a una mayor carga metabólica en la célula huésped al tener que sintetizar una mayor cantidad de proteína y provocar un estrés del retículo endoplasmático. Podríamos mejorar la expresión reduciendo este estrés metabólico acortando la proteína tEGFR, la cual solo es utilizada como marcador de expresión. (17)

Mediante el Western Blot en condiciones reductoras pudimos evaluar que el tamaño de las construcciones era el esperado. Por otra parte, no pudimos analizar una posible multimerización de los CAR en condiciones no reductoras, puesto que el tamaño de los dímeros era demasiado grande para un gel de acrilamida al 10%. Aparte de utilizar geles con menores concentraciones de acrilamida, sería interesante realizar una electroforesis en 2 dimensiones para analizar más en profundidad los dímeros que forma. Diversos estudios han observado que la formación de dímeros y las interacciones del CAR con el TCR endógeno, son relevante para su actividad del CAR, siendo el dominio transmembrana el que más involucrado estaría en este proceso.(18) (11)

5.2 Efectividad del CAR Corto vs CAR Largo

Al analizar la activación *in vitro* a las 24 horas en células Jurkat, hallamos una producción de IL-2 tanto en el grupo con el CAR Largo como en el grupo con el CAR Corto. De los dos grupos el que mayor cantidad de IL-2 produce es el grupo del CAR Largo, lo que nos podría indicar una mayor activación de las células.(19)

En los estudios de citotoxicidad *in vitro* hemos podido comprobar la eficacia de los CAR. Con respecto a la efectividad del CAR hemos observado que el CAR Corto es significativamente más efectivo que el CAR Largo, siendo el CAR Corto en el ratio 1:1 igual de efectivo que el CAR Largo en el ratio 1:9. Debemos repetir el experimento con ratios más bajos para poder analizar las diferencias más en profundidad, puesto que en la primera medida ya no quedaban células diana vivas en el grupo del CAR corto.

Los datos de producción de IL-2 más altos en el ensayo de citotoxicidad corresponden a los grupos con menores niveles de citotoxicidad. Esto es debido a que aquellos grupos en los que el CAR fue más eficaz, a las 48 horas no tienen células con las que activarse y ya han consumido toda la IL-2 que produjeron, sin embargo, los grupos con menor activación aun la siguen sintetizando y no han consumido tanta cantidad. (19)

Esto puede también extrapolarse a los resultados obtenidos en el ensayo de activación *in vitro* con células Jurkat, donde el CAR que mayor producción de IL-2 presentaba era el CAR Largo. Para poder analizar la producción de IL-2 de las construcciones con mayor activación deberíamos evaluarlo a tiempos más tempranos.

En el estudio *in* vivo de la eficacia de la terapia con células CAR-T, hemos obtenido que el tratamiento produce diferencias estadísticamente significativas. De los dos CAR el que mejor resultados obtiene es el CAR Largo, lo que se contradice con nuestros resultados *in vitro* ,pero sigue la tendencia esperada.(20)

Cuando evaluamos la mejora de la eficiencia del CAR al añadirle un espaciador encontramos resultados contradictorios. Mientras que vemos que en los ensayos *in vitro* el CAR Corto presenta una mayor funcionalidad, en el ensayo *in vivo* es el CAR Largo el que obtiene mejores resultados.

Comparando todos los datos obtenidos podemos hipotetizar que la razón por la que el CAR Corto funciona peor *in vivo* que el CAR Largo, aunque tiene mayor citotoxicidad *in vitro,* es porque sufre un exceso de activación. Por tal razón las células que tienen el CAR Corto, al tener unos niveles demasiado altos de activación entrarían en apoptosis. Esta muerte celular inducida por un exceso activación ha sido observada en otros estudios con CAR y es importante de evaluar pues afecta a la expansión y persistencia del tratamiento una vez aplicado a los pacientes. (21)

Por consecuencia, en un experimento de larga duración como es un *in vivo*, la población de células con el CAR Largo sería mayor y conseguirán una mayor eficacia, mientras que en los estudios *in vitro* donde los tiempos son más cortos no podemos observar estos efectos.

5.3 Inhibición a traves del KIR2DL1

A la hora de evaluar la acción inhibitoria del KIR, hemos hallado que el KIR2DL1 inhibe la acción citotóxica en las células que expresan el HLA que reconoce, aunque no consigue un efecto total de inhibición.

En el caso de las células HL60 que expresan el HLA que es reconocido por el KIR (HLA-C1), observamos una inhibición total en los ratios más bajos y una inhibición parcial en el ratio más alto. Por otra parte en las células TPH1 que expresan el HLA-C2 vemos una inhibición parcial en el ratio más bajo, lo que nos podría estar indicando que se está produciendo una inhibición inespecífica débil por parte del KIR2DL1.

Esta inhibición inespecífica puede ser provocada por interacciones entre el KIR2DL1 y los diversos HLA que son expresados por las células TPH1, pero para confirmarlo deberíamos generar células carentes de HLA mediante CRISPR-Cas 9 y que solo expresen nuestro HLA de interés.(13)

5.4 Generación de la proteína quimérica

Hemos podido producir satisfactoriamente nuestra proteína quimérica del KIR2DL1 y la región intracelular de PD1. Tras ver que la proteína es expresada correctamente debemos caracterizar su actividad y compararla con el resto de las construcciones.

6. Conclusión

Tras estudiar las diferentes construcciones hemos podido observar que todos los CAR y los KIR son capaces de expresarse correctamente y llegar a la membrana celular, sin embargo debemos optimizar las técnicas de transducción utilizadas para disminuir la variabilidad entre experimentos.

Hemos observado que al contrario que los resultados obtenidos en otros estudios, al añadir un espaciador al CAR sus niveles de citotoxicidad no aumentan sino disminuyen. En futuros experimentos debemos analizar más en profundidad los efectos del espaciador en el reconocimiento de nuestro epítopo y comprobar su impacto en la activación de la células.

A pesar de todo hemos obtenido mejoras en el rendimiento de nuestro CAR al añadir un espaciador, pues gracias a él reducimos los niveles excesivos de activación que se han observado en la versión del CAR Corto. Otras mejoras deben ser estudiadas para mejorar la persistencia del CAR Corto *in vivo* y aprovechar sus altos niveles de citotoxicidad.

El poder de inhibición del KIR2DL1 ha demostrado no ser los suficiente potente para inhibir totalmente al CAR, pero si para reducir significativamente su actividad. El poder inhibitorio de las quimeras del KIR2DL1 con PD-1 u otras proteínas inhibitorias podría mejorar los resultados.

Estos hallazgos abren la posibilidad del uso del biomarcador CD33 para el tratamiento de la LMA, pero son necesarios más estudios y optimizaciones antes de poder avanzar a ensayos clínicos.

7. Bibliografía

1. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Vol. 31, Blood Reviews. Churchill Livingstone; 2017. p. 63-76.

2. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Haploidentical Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Current Therapies, Challenges and Future Prospective. Vol. 11, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2021.

3. Laszlo GS, Estey EH, Walter RB. The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia. Blood Rev. 2014;28(4):143-53.

4. van den Bulk J, Verdegaal EME, de Miranda NFCC. Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours. Vol. 8, Open Biology. Royal Society Publishing; 2018.

5. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. Vol. 11, Blood Cancer Journal. Springer Nature; 2021.

6. June CH, O'connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer [Internet]. Available from: http://science.sciencemag.org/

7. Pan K, Farrukh H, Chittepu VCSR, Xu H, Pan C xian, Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. Vol. 41, Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. BioMed Central Ltd; 2022.

8. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. Vol. 3, Cancer Discovery. 2013. p. 388-98.

9. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. ScFv antibody: Principles and clinical application. Vol. 2012, Clinical and Developmental Immunology. 2012.

10. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Till BG, et al. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric T cell receptors is modulated by target epitope distance from the cell membrane NIH Public Access [Internet]. Vol. 180, J Immunol. 2008. Available from: www.jimmunol.org.

11. Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, Blaylock M, Holland M, Gilham DE. The Optimal Antigen Response of Chimeric Antigen Receptors Harboring the CD3ζ Transmembrane Domain Is Dependent upon Incorporation of the Receptor into the Endogenous TCR/CD3 Complex. The Journal of Immunology. 2010 jun 15;184(12):6938-49.

12. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. Vol. 58, EBioMedicine. Elsevier B.V.; 2020.

13. Torres-garcía D, Barquera R, Zúñiga J. REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades [Internet]. Vol. 21, Segunda Época. 2008. Available from: www.iner.gob.mx57www.medigraphic.com

14. Djaoud Z, Parham P. Annual Review of Biochemistry HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. 2020; Available from: https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-

15. Tao L, Farooq MA, Gao Y, Zhang L, Niu C, Ajmal I, et al. CD19-CAR-T cells bearing a kir/pd-1-based inhibitory car eradicate cd19+hla-c1− malignant b cells while sparing cd19+hla-c1+ healthy b cells. Cancers (Basel). 2020 sep 1;12(9):1-17.

16. Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, Amberger M, Quade-Lyssy P, et al. CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. Gene Ther. 2021 sep 1;28(9):560-71.

17. Hussain H, Maldonado-Agurto R, Dickson AJ. The endoplasmic reticulum and unfolded protein response in the control of mammalian recombinant protein production. Vol. 36, Biotechnology Letters. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 1581-93.

18. Muller YD, Nguyen DP, Ferreira LMR, Ho P, Raffin C, Valencia RVB, et al. The CD28-Transmembrane Domain Mediates Chimeric Antigen Receptor Heterodimerization With CD28. Front Immunol. 2021 mar 23;12.

19. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Vol. 12, Nature Reviews Immunology. 2012. p. 180-90.

20. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. Cancer Immunol Res. 2015 feb 1;3(2):125-35.

21. Huan T, Chen D, Liu G, Zhang H, Wang X, Wu Z, et al. Activation-induced cell death in CAR-T cell therapy. Vol. 35, Human Cell. Springer Japan; 2022. p. 441-7.

8. Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi Padre por haberme dado todo lo que tengo a día de hoy y todos los esfuerzos que ha hecho para sacarnos adelante. A toda mi familia, a mis hermanos y especialmente a mi tía Inés, que me ha cuidado y ayudado como si fuera un hijo suyo. A los que ya no están les agradezco todo lo bueno que hicieron por mi cuando todavía estaban.

Agradezco también a todos las personas que han cruzado por mi vida a lo largo de la carrera tanto en Madrid, Bologna como Tarragona, que me han hecho madurar y crecer como persona. Pero en especial a mis amigos, que han hecho que 4 años de carrera pasen a la velocidad de la luz.

Por último agradecer a Hisse por darme la oportunidad de aprender con ellos, a Lydia por ser una excelente profesora y a todos mis compañeros del 221 que me han ayudado y acogido desde el primer momento.

9. Autoevaluación

Tras finalizar la escritura de este Trabajo de fin de Grado he podido valorar todos los conocimiento que obtenido a lo largo de mi carrera, desde mi inicio en la educación primaria hasta mis prácticas en la universidad. He necesitado aplicar conocimientos de distintos ámbitos para poder generar una información que genere un avance en un campo de investigación tan importante como es la lucha contra el cáncer.

Además, tras haber tenido que explicar unos conocimientos que yo ya creía entendidos, ha hecho que interiorice y entienda mejor todo lo que he estudiado en este proyecto. Gracias a este trabajo me he podido informar con más profundidad de todo lo que está relacionado con la terapia con células CAR-T y el gran futuro que hay en ello.

Considero este trabajo como una superación personal que me ha permitido darme cuenta de las complejidades del mundo de la investigación.