



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Avances en inmunoterapia antitumoral

Anti-tumoral immunotherapy advances

Autor: D. Claudia Iglesias Carrasco

Director/es: D. Jesús Merino Pérez

Santander, Junio 2020

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Jesús, mi tutor en este trabajo, que me ha acompañado a lo largo de estos meses y me ha ayudado a entender la belleza de la inmunología y que lo lleva haciendo así desde que nos enseñó las bases de la misma en el primer curso de esta larga carrera. Gracias por ayudarme y apoyarme, transmitiéndome siempre tranquilidad y confianza.

Gracias también a todos los profesores, médicos, enfermeras y resto de equipo sanitario que me han hecho sentir como en casa durante toda mi formación en el HUMV. Espero poder seguir vuestro ejemplo.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis padres, su apoyo incondicional, siempre llevándome de la mano, pero dejándome libre para cometer errores y aprender. Por siempre estar detrás de cada decisión tomada sin presionarme ni agobiarme y por aguantarme cuando ni yo misma lo hacía. Sin ellos nunca me podría haber convertido en la persona que soy hoy y en la doctora que pretendo ser.

A mi melliza, mi mitad, que me enseña y me motiva a ser mejor. Incluso sin darte cuenta, me muestras el camino correcto día a día. Me complementas y mi vida no sería la misma sin ti. Agradecer también al resto de mi familia y en especial a mis abuelos por formar parte de esta red de apoyo que considero imprescindible.

A mis amigas y amigos de la carrera, gracias por compartir conmigo batallas, agobios, llantos, pero también risas, fiestas y buenos momentos. Estos seis años nos han permitido crecer y madurar, juntos. Ya sois parte esencial en mi vida, y esto, es solo el principio.

A las de siempre, mis asturianas, gracias por hacerme entender lo que significa echar de menos. Que escuchan y aguantan mis quejas, y se ríen con cada anécdota que les cuento. Siempre seréis mi casa.

Por último, y lo más importante para mí, quería dedicar este trabajo a mi tía, Conchita. Gracias por inspirarme, animarme e impulsarme a estudiar esta carrera y a elegir este trabajo. Siempre serás mi ejemplo a seguir, y aunque ya no puedas verlo, sé que estarías tan orgullosa de mí como yo siempre lo estaré de ti.

ÍNDICE

1. Respuesta inmunitaria en el cáncer.....	5
2. Vigilancia inmunológica e inmunoeediting en el cáncer. Escape tumoral.....	8
3. Inmunoterapia antitumoral: Introducción.....	12
4. ¿Qué son los puntos de control inmunitario y sus inhibidores (ICIs).....	14
4.1. Los ICIs y sus aplicaciones	17
4.2. Los retos de los ICIs: terapias combinadas, toxicidad y resistencia.....	23
4.2.1. Terapias combinadas.....	23
4.2.2. Toxicidad relacionada con el uso de ICIs.....	24
4.2.3. Resistencia a la terapia con ICIs.....	25
5. Nuevas formas de inmunoterapia con células T.....	28
5.1. Terapia con TILs (linfocitos infiltrantes de tumor).	28
5.2. Terapia con TCRs.....	29
5.3. ¿Qué son las CAR T cells?	31
5.3.1. El receptor CAR	33
5.3.2. Las CAR T cells en clínica: target CD19.....	34
5.3.3. Otros targets	36
5.3.4. Problemas y desafíos en la utilización de las CAR-T cells.....	37
6. Conclusiones.....	45
7. Bibliografía.....	47

Resumen: La terapia antitumoral está siendo uno de los campos de investigación con perspectiva más prometedora de los últimos años, llegando a su punto álgido con la consecución del Nobel de Medicina en 2018, gracias al descubrimiento del importante papel de los inhibidores de puntos de control inmunitario (*immune checkpoints inhibitors* o ICIs) que consiguen liberar los frenos de la respuesta inmune y relanzar al sistema inmunitario para atacar el cancer. No obstante, en este campo que avanza y crece cada vez más rápido, despuntan ahora otras estrategias de inmunoterapia de base celular. En este sentido, algunos de los avances más importantes de los últimos años están siendo las terapias con células T de receptor quimérico (*CAR-T cells*), que han supuesto una auténtica revolución en el tratamiento de las neoplasias hematológicas.

En este trabajo, se analizan las interacciones entre el sistema inmunitario y el tumor, el papel de los *immune check points* y de sus inhibidores (los ICIs), así como las diferentes terapias de base celular, en especial las CAR-T cells. Se profundiza en los protocolos ya aprobados, así como en los desafíos a los que se enfrentan estas nuevas terapias.

Abstract: Anti-tumoral immunotherapy is being one of the most developed and promising pathways of investigation in the recent years, reaching its peak with the 2018 Nobel prize in Medicine award thanks to the discovery of the important role of immune checkpoint inhibitors or ICIs when it comes to releasing the brakes of the immune response and thereby unleashing our immune cells to attack tumors. However, in this rapidly advancing and growing field, cell-based immunotherapy strategies are now emerging. In this sense, one of the most important advances in recent years has been the chimeric receptor T-cells (CAR-T cells) therapies, which have brought a real revolution in the treatment of hematological malignancies.

In this work, we discuss the interactions between the immune system and cancer, the role of immune checkpoints and their inhibitors, as well as the different cell-based therapies, specifying even more in CAR-T cells. Digging deeper into current approvals as well as the challenges these new therapies face.

Palabras clave: inmunoterapia antitumoral, CTLA-4 inhibitors, PD1 inhibitors, CAR-T cells, adoptive cell therapy.

Objetivos: Revisión bibliográfica sistemática de los últimos avances en inmunoterapia anti-tumoral, destacando los inhibidores de CTLA4, PD-1 y PD-1L (immune-checkpoint inhibitors, ICIs) y, la terapia celular adoptiva, más concretamente el papel de las CAR-T cells.

Metodología: Búsqueda en las bases de datos de PubMed con los conceptos “immune checkpoint inhibitors”, “cancer immunotherapy”, “CTLA-4”, “PD-1”, “adoptive cell therapy”, “CAR-T cells”, “TCR therapy”, “TIL therapy”; acotando los parámetros de búsqueda a los últimos 3 años de bibliografía. Lectura comprensiva, síntesis y explicación sistemática del contenido de los artículos encontrados, empleando la bibliografía aportada en los mismos.

1. Respuesta inmunitaria en el cáncer.

Los científicos tuvieron la idea de manipular el sistema inmunitario para que éste ataque al cáncer hace más de 100 años. Sin embargo, lograr que el sistema inmunitario hiciera eso fue un proceso lleno de desafíos y contratiempos. Antes de que se pudiera administrar una inmunoterapia de forma segura y eficaz a los pacientes, la comunidad médica debía lograr una comprensión más profunda tanto de la biología del cáncer como del sistema inmunitario.

Para poder comprender este trabajo, es necesario establecer las bases que relacionan al sistema inmunitario con el cáncer.

Como sabemos la respuesta inmune consta de dos componentes principalmente: La inmunidad innata e inmunidad adaptativa, ambas se relacionan de forma obligatoria para que el sistema inmunológico funcione correctamente.

Por un lado, tenemos la inmunidad innata, dentro de ella se engloban diferentes estirpes celulares como células epiteliales, células dendríticas, monocitos, macrófagos, polimorfonucleares (PMN), células natural killer (NK). Como puente de conexión entre ambos tipos de respuesta, encontramos diversos subtipos de linfocitos (linfocitos B CD5+ y linfocitos T- $\gamma\delta$). También se involucran diversos factores humorales, entre ellos, una legión de citocinas, linfocinas y quimiocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α , IFN- γ , etc.), el importante sistema del complemento, enzimas, transportadores iónicos de membrana, carbohidratos complejos, etc. Todas ellas actuando en colaboración con diferentes receptores en las células. [1] [2]

Por otro lado, la respuesta inmunitaria adaptativa es bastante más compleja. En ella, tenemos a los linfocitos B y los linfocitos T que, a diferencia de las células de la RII, son células monoespecíficas. En los genes que codifican la inmunoglobulina de la membrana de cada linfocito B, y que constituye su receptor (BCR), así como en las cadenas del receptor clonotípico para el antígeno de cada linfocito T (TCR) se producen reordenamientos que originan una enorme variedad clonal de ambos tipos de linfocitos. De esta forma, cuando el BCR o el TCR de un linfocito concreto reconoce su antígeno se produce una expansión clonal de ese linfocito, originando tanto linfocitos efectores como linfocitos memoria específicos para el antígeno o antígenos desencadenantes de la respuesta. La activación de los linfocitos requiere la ayuda de otras señales coestimuladoras (CD28 en las células T, CD40 en las células B). La activación de las células T es más compleja que la de las células B, ya que requiere la participación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que presenta al receptor TCR de los linfocitos T antígenos procesados en diferentes poblaciones celulares. Finalmente, existe una amplia variedad de citocinas que desempeñan un papel fundamental en la comunicación entre células de la inmunidad adaptativa y la inmunidad innata. [1] [2]

Explicando con más detalle el papel de las moléculas MHC, las moléculas de clase I presentan antígenos endógenos de las células T-CD8⁺, procesados previamente por el

proteasoma y otras organelas. Estos antígenos son expresados junto a la MHC-I en la membrana de prácticamente todas las células del organismo. El linfocito T CD8⁺ reconoce este complejo mediante su TCR teniendo un papel fundamental en la inmunovigilancia, permitiendo al sistema inmunitario diferenciar aquellas células propias de otras nocivas para el organismo, como por ejemplo las células tumorales. La activación de un linfocito T CD8⁺ al unirse mediante su TCR a un complejo antígeno-MHC I desencadenará una respuesta citotóxica directa en las condiciones adecuadas. [1] [2]

Las moléculas MHC de clase II se expresan principalmente en las denominadas células presentadoras de antígeno (*antigen-presenting cells*, APC). Dentro de las APCs tenemos principalmente linfocitos B, macrófagos y, las células dendríticas. En las MHC-II son presentados aquellos antígenos exógenos que han sido reconocidos, internalizados (en el caso de los linfocitos B por internalización del BCR, en los macrófagos por fagocitosis y en las células dendríticas por endocitosis) y procesados por dichas APCs. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen estos complejos antígeno- MHC II que presentan las APCs y, dado que las propias APC son capaces de transmitir señales coestimuladoras necesarias, activan la respuesta linfocitaria de la célula T CD4⁺, que a su vez libera múltiples citocinas siendo capaz de estimular la respuesta de diversas células inmunitarias (macrófagos, linfocitos B, linfocitos T CD8⁺ citotóxicos) de forma específica para el antígeno reconocido. [1,2]

Concretando en el caso de las células B, cuando el antígeno es reconocido por el BCR del linfocito B, éste lo internaliza y lo procesa para que sea presentado al linfocito T a través de MHC clase II junto a otras señales coestimuladoras, este linfocito T al que le está presentando el antígeno, es capaz de devolverle la señal, estimulando aún más el propio linfocito B. De esta manera, la misma célula B se activa induciendo proliferación, cambiando el subtipo de anticuerpos que puede producir y diferenciándose a célula plasmática secretora de anticuerpos específicos. Mediante estos anticuerpos, el linfocito B es capaz de activar el sistema del complemento. El complemento, entre otras funciones (opsonización, producción de las anafilotoxinas C3a y C5a, etc.), activa macrófagos y neutrófilos estimulando su actividad fagocítica. Otras veces, los Acs desencadenan la denominada citotoxicidad dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) por parte de las células NK. [1]

Prestando atención a este proceso de reconocimiento antigénico nos damos cuenta de la importancia que tiene la comunicación entre los diferentes componentes de la respuesta inmunitaria. De forma resumida, cuando el antígeno en cuestión es identificado por linfocitos B con anticuerpos de membrana específicos o bien es procesado por las propias APCs, estas lo presentan a través de las moléculas MHC de clase I o II a los linfocitos T (CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente) y, en caso de que las señales coestimuladoras explicadas anteriormente se produzcan de manera correcta, se desencadena una respuesta específica por parte de las diferentes clases de linfocitos T. [1,2]

Individualizando en el caso de los tumores, juega un papel esencial la llamada presentación cruzada de antígenos (*antigen cross-presentation*) y la consecuente activación cruzada de los linfocitos T-CD4⁺ y T-CD8⁺ (*T-cell cross-priming*). [3] Los antígenos tumorales se presentan generalmente en las membranas de las propias células malignas mediante moléculas MHC-I debido a sus características, a su vez estas células tumorales carecen de moléculas coestimuladoras para activar al linfocito T naïve. [1,3] De esta forma, no existiría la respuesta citotóxica directa explicada anteriormente por parte de los linfocitos T-CD8⁺, a excepción de que una célula T-CD4⁺ que sí es capaz de proporcionar las señales coestimuladoras necesarias para desencadenar la respuesta celular, haya producido la estimulación previamente. [1,3]

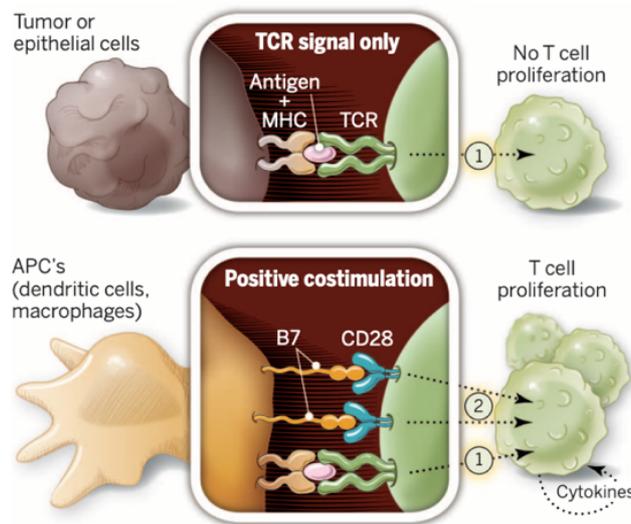


Figura 1. La activación de células T ocurre solo después de la interacción entre el receptor de células T (TCR) y el antígeno en el contexto de MHC (señal 1) más la coestimulación de CD28 (señal 2). Sharma, P, et al. The future of immune checkpoint therapy. Science, (2015).

Las células dendríticas son las APC más eficientes para este proceso de presentación cruzada, y de forma particular un subtipo de ellas (*cDC1b, conventional dendritic cell 1b*) ya que poseen una gran capacidad de procesar antígenos exógenos, a través de receptores como el DNGR-1 detectan patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs) y captan material necrótico para procesar dichos antígenos. [3]

Una vez que el antígeno es reconocido, la célula dendrítica se activa y, presenta dicho antígeno tanto en moléculas MHC-I como MHC-II en el ganglio linfático de drenaje al que ha migrado. Así es como la célula dendrítica es capaz de desencadenar la respuesta tanto de los linfocitos T CD8⁺ como de los T CD4⁺ de forma simultánea. Estos linfocitos T CD4⁺ son los que a su vez van a ser capaces de producir las señales coestimuladoras necesarias para activar a más células T CD8⁺ que no se activarían de forma individual, como se refería en el proceso de activación de linfocitos T por parte de los antígenos tumorales. [1,3]

Para terminar debemos destacar el concepto de muerte celular inmunogénica (immunogenic cell death, ICD) el cual está íntimamente ligado al concepto de inmunogenicidad tumoral, favoreciendo el proceso de activación cruzada y la función de las células dendríticas. El ICD puede inducir una respuesta inmune adaptativa contra antígenos presentes en la célula tumoral generando en estas un proceso activo de apoptosis. La célula tumoral libera alarminas y factores quimiotácticos que conllevan activación de las células dendríticas y es capaz de hacerlo de varias maneras: (I) atrayendo células dendríticas a la célula tumoral apoptótica, (II) aumentando la captación, el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales de la propia célula en apoptosis por parte de las células dendríticas y (III) dando licencia a las células dendríticas para la activación de linfocitos T citotóxicos. [3]

2. Vigilancia inmunológica e *immunoediting* en el cáncer. Escape tumoral.

Como ya hemos explicado existe una estrecha relación entre el sistema inmunitario y el desarrollo del cáncer. El sistema inmunitario es un conglomerado de moléculas, células y tejidos que, mediante complejas interacciones lleva a cabo la llamada vigilancia inmunológica (*immunosurveillance*), por la cual detecta y reacciona frente a todo aquello extraño al propio organismo (y potencialmente nocivo, como podría ser un agente infeccioso o una estirpe celular tumoral), mientras que respeta y evita dañar lo propio, lo que se denomina autotolerancia. [4]

La capacidad que tiene el sistema inmunológico de controlar el crecimiento de neoplasias se ha discutido con controversia durante muchos años. En 1909, Paul Ehrlich describió la importante función del sistema inmune para proteger al huésped contra el cáncer. A mediados del siglo XX, Burnet y Thomas postularon el concepto ya mencionado de vigilancia inmunológica, tratando de demostrar que pacientes con un sistema inmune deficiente eran más susceptibles a desarrollar tumores malignos. [5-6]

En la década de los 90, la aparición de modelos de ratas inmunodeprimidas permitió reafirmar esta hipótesis de la vigilancia inmunológica. Se demostró la importancia del interferón- γ (IFN- γ) endógeno para proteger al huésped del desarrollo tumoral. Estos estudios mostraron que la neutralización de IFN- γ en ratones, resultó en un rápido crecimiento de tumores. Además, aquellos ratones que carecían de capacidad de respuesta a IFN- γ , de receptor para IFN- γ o del factor transductor de señal y activador de la transcripción 1 STAT1 (un factor de transcripción importante en la regulación de la señalización del receptor de IFN- γ) fueron más sensibles a la carcinogénesis inducida, en comparación con los ratones sin estas deficiencias. Así mismo, se describió el importante rol de la perforina, una proteína citolítica encontrada en los linfocitos T citotóxicos, muy presente en la respuesta inmune contra el crecimiento tumoral. Estos hallazgos clave reavivaron el interés en la inmunovigilancia del cáncer, de hecho, el papel importante que tiene el sistema inmune en el control del

crecimiento tumoral y la metástasis es ahora la base de la mayoría de las inmunoterapias contra el cáncer. [5,6]

Tras décadas de estudio, sabemos que el sistema inmunitario interactúa íntimamente con los tumores durante todo el proceso de desarrollo de la enfermedad y la progresión a metástasis. Esta compleja relación cruzada entre la inmunidad y las células cancerosas puede a la vez inhibir o favorecer el crecimiento tumoral. El equilibrio entre las acciones anti-tumorales y pro-tumorales de la interacción del sistema inmune con las células cancerosas determina el resultado final, y estos procesos son ahora conocidos como uno de los sellos distintivos del comportamiento del cáncer [7,9].

Los nuevos mecanismos identificados que provocan este escape del ataque inmunitario incluyen: (I) la selección de variantes tumorales resistentes, también denominado inmunoedición, y (II) la formación progresiva de un entorno inmunosupresor dentro del propio tumor, que se conoce como microambiente tumoral, favorecido a su vez por la inflamación crónica. [8,9]

I) Inmunoedición.

Cuando hablamos de la selección de variantes tumorales resistentes, tenemos que destacar que el propio sistema inmune puede amoldar la inmunogenicidad de las neoplasias. Para describir esta capacidad del sistema inmunológico se creó el concepto de inmunoedición. La inmunoedición es un proceso mediado por la presión de selección inmunológica, de forma que las células tumorales se van moldeando. En este proceso se favorece la supervivencia de células tumorales con una menor inmunogenicidad, capaces de escapar al reconocimiento por parte del sistema inmune, aunque éste sea completamente funcional. Este mecanismo de inmunoedición se considera un refinamiento de la hipótesis de vigilancia inmunológica. Es un proceso dinámico y se divide principalmente en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. [6]

La fase de eliminación corresponde al concepto original de inmunovigilancia contra el cáncer, según el cual el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo trabajan en conjunto para que las células tumorales sean reconocidas y eliminadas con éxito, devolviendo así los tejidos a su normal funcionamiento. La infiltración de células inmunes en tumores es una observación bien documentada en la mayoría, si no en todos, los tumores sólidos. [6] El sistema inmune se activará por señales clásicas como IFN-gamma, los DAMPS (patrones moleculares asociados a daño), y ciertas proteínas de superficie de las células premalignas. Durante esta fase es importante la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), incluyendo CD4, CD8, células Natural Killer (NK), macrófagos y células dendríticas que, en conjunto, llevan a cabo una respuesta inmunitaria eficaz contra el cáncer incipiente. Ante la ausencia de estas señales de peligro, las células transformadas pueden pasar desapercibidas por el sistema inmune. [1,4]

Las células tumorales que eluden la fase de inmunovigilancia progresarán a la llamada fase de equilibrio, donde la expansión tumoral y las metástasis son mínimas (latencia tumoral) y, generalmente, esta fase ocurre sin síntomas. [10] La interacción constante del sistema inmune con el tumor durante un largo período de tiempo mediante la presión de selección inmune, puede inducir la formación de células tumorales con una inmunogenicidad reducida, que tendrán una mayor capacidad de supervivencia. De esta forma se puede esculpir el fenotipo del tumor en desarrollo. Así se explica la aparentemente paradójica formación de tumores en individuos con un sistema inmunológico intacto. Durante la fase de equilibrio, se produce de forma simultánea la eficiente eliminación de células tumorales y una persistente formación de variantes celulares resistentes menos inmunógenas que evadirán la respuesta inmune y llegarán a la fase de escape tumoral. Es posible que el equilibrio sea la fase más larga de los tres procesos en la inmunoección del cáncer. [6]

Los tumores que ya no son susceptibles al ataque inmunitario progresan hacia la última fase de la inmunoección, denominada "escape". La aparición de síntomas clínicos generalmente se correlaciona con esta etapa. El tumor subvierte el sistema inmune, ya sea directamente a través de su fenotipo no inmunogénico, o indirectamente a través de una variedad de mecanismos inmunosupresores, tanto intrínsecos como extrínsecos al tumor. [4,6]

II) Microambiente tumoral e inflamación crónica.

Los mecanismos intrínsecos de las células tumorales incluyen: (I) reducción en la expresión de antígenos específicos tumorales a su vez reduciendo también la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I), (II) impedir que los antígenos peptídicos que sí que se presentan, se acoplen a las moléculas de MHC clase I, (III) reducción de expresión de factores coestimuladores al tiempo de un aumento de expresión de factores inhibitorios como PD-L1 y (IV) aumento de la secreción de mediadores inmunosupresores. [1,4]

Como mecanismo intrínseco también debemos prestar atención a un proceso denominado **senescencia inducida por oncogenes** (*oncogene-induced senescence*, OIS), por el cual las células tumorales entran en senescencia, produciendo modificaciones en el ambiente inmunológico. Las células precancerígenas paran su ciclo celular, activando varias rutas oncogénicas (mutaciones en RAS, NF-κB, STAT3, p53, mTOR, NOTCH1). De esta forma se transforman en las llamadas SASP (*senescence-associated secretory phenotype* por sus siglas en inglés) o células con un fenotipo secretor asociado a senescencia, que modulan el entorno inmunológico. Esta influencia que tienen las SASP sobre su entorno puede ser diferente en función de distintos factores. Las SASP tienen un efecto dual. Por un lado, pueden favorecer la eliminación inmunológica de las células premalignas. Pero también pueden hacer lo contrario, produciendo un estado de inflamación crónica, induciendo la activación de macrófagos y neutrófilos inmunosupresores que a su vez inhiben la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK. La diferencia entre una acción u otra radica en los diferentes

mediadores inmunológicos secretados por las células SASP que, a su vez, depende de la conformación genética de la célula premaligna. [11]

Junto con los mecanismos intrínsecos de las células tumorales, tenemos mecanismos extrínsecos. Ejemplos de estos mecanismos son: las células T reguladoras (FoxP3⁺), las células supresoras de estirpe mieloide, y los macrófagos M2. [1,4] Varios estudios han demostrado que las T-regs presentes en los tumores tienen una actividad supresora comparativamente más alta que las T-regs naturales que circulan de forma fisiológica [12]. Las T-regs se introducen en el microambiente tumoral mediante la producción de quimiocinas inducidas por las células tumorales. La evidencia también sugiere que el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), producido por las células tumorales entre otras células, ayuda a la conversión de las células T-CD4⁺ en T-regs supresoras in situ [13]. Por otro lado, los macrófagos son células funcionalmente plásticas y pueden alterar su estado de polarización para adaptarse a diferentes condiciones fisiológicas. Los macrófagos varían de estados de polarización M1 a M2: los macrófagos M1 "activados clásicamente" producen citocinas proinflamatorias tipo I, participan en la presentación de antígenos y juegan un papel antitumoral. Por el contrario, los macrófagos M2, promueven respuestas antiinflamatorias y tienen funciones pro-tumorigénicas. Se ha sugerido que condiciones ambientales como la hipoxia tumoral pueden mediar esta transición. De hecho, los TAMs (tumor-associated macrophages) se acumulan en regiones de hipoxia en tumores en crecimiento [14,15]. Los macrófagos fenotipo M2 producen altos niveles de TGF- β , IL-10 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promoviendo el crecimiento tumoral por formación de nuevos vasos sanguíneos, que aportan oxígeno al tumor [8,16,17]. Finalmente, las "células supresoras mieloides" (MDSC) surgen de la mielopoyesis aberrante que ocurre en el cáncer, se movilizan durante la tumorigénesis y se infiltran en los tumores en desarrollo donde también promueven la vascularización tumoral y alteran los mecanismos principales de inmunovigilancia incluida la presentación de antígenos por las células dendríticas, la activación de las células T, la polarización de los macrófagos M1 y la inhibición de la citotoxicidad de las células NK. Además, las células dendríticas moduladas están funcionalmente deterioradas y muestran niveles más bajos de CD80, CD86, CD40 y una alta expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que también contribuye a la supresión de la respuesta de las células T. [8,16]

Todos estos factores extrínsecos e intrínsecos emergen en el microambiente tumoral y suprimen la inmunidad, ayudando así a las células tumorales a expandirse y escapar. También pueden actuar como mediadores del inicio del tumor, la angiogénesis y las metástasis. [1,4,8]

Cabe destacar que todo este ambiente inmunosupresor está directamente influenciado por diversas mutaciones genéticas del tumor, como ocurría con el proceso de senescencia mencionado más arriba. Ejemplos de estas mutaciones son la relación entre sobreexpresión del gen MYC-N y la inhibición de factores activadores de células NK en neuroblastomas, la mutación en las janus kinasas 1 y 2 (JAK1/2) relacionado con

una alteración de la expresión de PD-L1, mediada por interferón, o tumores pulmonares con mutación EGFR⁺ relacionados con un aumento de la expresión de PD-1L. [11]

Otros muchos factores están implicados en la relación entre células tumorales y sistema inmune, pero profundizar en ellos no es objetivo de este trabajo.

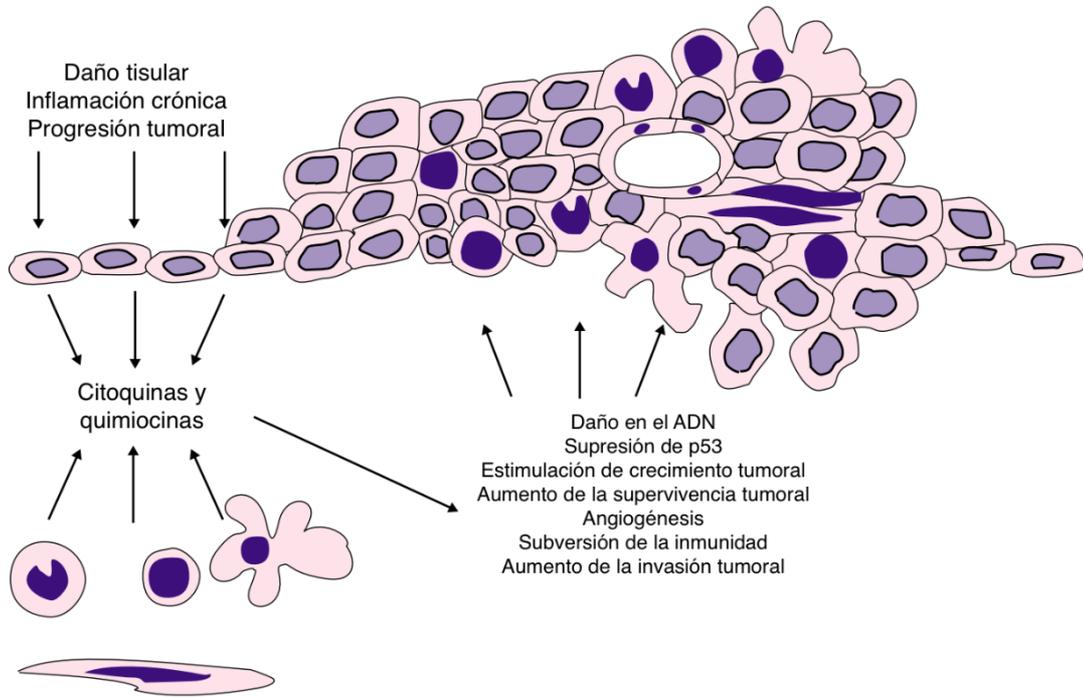


Figura 2: La inflamación crónica, el daño tisular pueden estimular las citoquinas y las quimiocinas que contribuyen al desarrollo de las neoplasias. [18, modificado]

3. Inmunoterapia antitumoral: Introducción

Cada día entendemos mejor los mecanismos que utiliza el cáncer para evitar al sistema inmunológico por lo que podemos desarrollar fármacos dirigidos a esos mecanismos y conseguir que, de nuevo, el sistema inmunológico pueda controlar el tumor. Es importante destacar que el rápido progreso clínico sucedido en los últimos años es el resultado de décadas de inversión en ciencia básica en diferentes campos. También es importante considerar la larga historia de esfuerzos para poder utilizar la potencia del sistema inmune como una modalidad terapéutica para el cáncer. [19] En 1863, el patólogo alemán Rudolf Virchow fue el primero en plantear la hipótesis del vínculo existente entre el desarrollo de tumores y el estado inflamatorio. Casi al mismo tiempo, el cirujano William Coley, conocido como pionero de la inmunoterapia contra el cáncer, demostró que algunos pacientes mostraban regresión tumoral tras la aparición de infección post operatoria por *Streptococcus pyogenes*. [11]

A lo largo del siglo siguiente, se aprobaron varias estrategias inmunoterapéuticas para su uso en el cáncer, incluidos el bacilo Calmette-Guerin, el interferón- α y la interleucina-2 (IL-2). Esto último es particularmente importante porque demostró, por primera vez, que el cáncer metastásico avanzado, específicamente el melanoma y el carcinoma de células renales, podría controlarse de forma duradera en un pequeño grupo de pacientes mediante el uso de esta citocina capaz de expandir las células T y las NK [19]. Hoy en día, como hemos explicado en la primera parte de este trabajo, está completamente establecido que la inflamación puede estar causalmente relacionada con el cáncer. Además, la inmunoterapia contra el cáncer ha revolucionado el tratamiento del cáncer, tanto que fue considerada por la revista *Science* como el Avance del año en 2013. Además, el éxito de estas terapias ilustra la importancia de la decodificación cuidadosa de la inmunología básica para una traducción clínica exitosa en el tratamiento del cáncer. [11, 20]

De forma global, existen tratamientos inmunológicos de muy diversos tipos y generalmente los clasificamos en dos grandes grupos, inmunoterapias específicas e inmunoterapias no específicas. La inmunoterapia específica está dirigida a provocar la respuesta inmune frente un antígeno o célula específica, dentro de este grupo tenemos las vacunas y la terapia celular adoptiva. Mientras que, la inmunoterapia inespecífica busca la estimulación global del sistema inmunológico sin focalizarla en un objetivo concreto, dentro de este grupo encontramos las citoquinas y los recientes inhibidores de “puntos de control” inmunológico.

Para poder hacer un análisis más detallado y actualizado, este trabajo se va a centrar en dos de las terapias más novedosas y prometedoras: los inhibidores de puntos de control inmunológico o ICis (immune checkpoint inhibitors) y la terapia con células T CAR. Estas últimas suponen el último avance en el campo de la inmunoterapia.

El cuerpo utiliza moléculas conocidas como puntos de control inmunitario para regular la fuerza y la duración de las respuestas inmunes, minimizando el daño al tejido sano. Algunos tumores producen algunas de estas moléculas suprimiendo así el sistema inmune. Por lo tanto, los inhibidores del punto de control inmunológico van a bloquear estas moléculas para que la respuesta inmune sea efectiva. Este grupo de fármacos ha demostrado utilidad en múltiples tumores, incluyendo melanoma, carcinoma de pulmón, cáncer renal y tumores de cabeza y cuello, entre otros.

Por otro lado, está la terapia celular adoptiva. Éste es un procedimiento aún experimental de extraordinaria complejidad técnica. Supone realizar una biopsia al paciente, extraer los linfocitos que están en el tumor y que se supone que son específicos de él y cultivarlos en el laboratorio, haciéndolos crecer en número para después volverlos a infundir, convenientemente activados, al paciente. Este procedimiento tiene una buena eficacia, pero es técnicamente muy complejo por lo que aún está en fase experimental. Una variante de este tipo de inmunoterapia serían las *CAR T cells*. En este caso se extraen linfocitos de la sangre del paciente y se modifican genéticamente para que reconozcan células del tumor mediante incorporación de un

receptor. Estos receptores incorporados son los CAR (receptores quiméricos de antígeno) que están empezando a ser utilizados en el tratamiento del cáncer con un éxito importante en las leucemias refractarias, entre otros.

Las nuevas técnicas de inmunoterapia son una estrategia prometedora para tratar el cáncer. Es posible que pueda controlar el crecimiento de los tumores y tener menos efectos secundarios que la quimioterapia. Si bien se han realizado avances apasionantes, la investigación se centrará en hacer que estos beneficios se extiendan a más y más pacientes. Los científicos también están explorando la forma de predecir quién responderá mejor a determinados regímenes de inmunoterapia.

4. ¿Qué son los puntos de control inmunitario y sus inhibidores (ICIs)

Para poder analizar en detalle el papel que tienen los ICIs en el tratamiento de las neoplasias, primero debemos establecer el papel exacto que tienen los propios check-point inmunológicos a los que pretenden bloquear estos ICIs.

Para el desarrollo correcto de la respuesta inmune, es de vital importancia que esta respuesta no sea excesiva para evitar dañar al tejido sano. Para ello, el S.I. dispone de ciertos mecanismos de autorregulación de la activación leucocitaria. Estos mecanismos son llevados a cabo principalmente por moléculas de membrana que, al interactuar con sus respectivos ligandos, inhiben la respuesta inmune de las células que las presentan, deprimiendo su activación. Estas moléculas son los llamados puntos de control inmunitario (*immune checkpoints*), dentro de los cuales tenemos dos moléculas muy importantes: (I) el PD-1 (*programmed cell death protein*) y su ligando el PD-L1 y (II) la molécula CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*). [4]

Como ya sabemos, el reconocimiento de los complejos antígeno-MHC por el receptor de antígeno de células T (TCR) no es suficiente para la activación de los linfocitos T vírgenes: se requieren señales coestimuladoras adicionales. Estas señales son proporcionadas por la unión de CD28 presente en la superficie de los linfocitos T con moléculas B7 (CD80 y CD86) presentes en la célula presentadora de antígeno (APC). [21] Niveles suficientes de CD28 y su consecuente unión a B7 conducen a la proliferación de células T, a una mayor supervivencia y diferenciación a través de la producción de citocinas como la interleucina-2 (IL-2), un aumento del metabolismo energético y una regulación positiva de genes de supervivencia celular. [22]

Inicialmente, CTLA-4 es una proteína intracelular. Sin embargo, tras la activación del linfocito T mediante el mecanismo explicado, se ponen en marcha mecanismos capaces de inducir la regulación positiva de CTLA-4 a la superficie celular por exocitosis de vesículas que la contienen. [22] Una vez translocada a la superficie, CTLA-4 compete con CD28 por unirse a los ligandos de esta molécula (B7-1 y B7-2), pero haciéndolo con una afinidad unas 40 veces superior a CD28. [19] Al quitarle los ligandos a CD28 limita la

señal coestimuladora. Además, en su porción intracelular tiene un dominio ITIM inhibidor de la activación celular mediante el reclutamiento de fosfatasa que acaban por apagar al linfocito T. De esta forma CTLA-4 inhibe a la célula T, resultando en la detención tanto de la proliferación como de la activación de ésta. La cantidad relativa de unión de CD28/B7 frente a CTLA-4/B7 determina si una célula T experimentará activación o anergia. Además, hay evidencias que sugieren que la unión de CTLA-4 a B7 puede producir directamente señales inhibitorias que contrarrestan las señales estimuladoras producidas tras la unión de CD28/B7 y TCR/MHC-antígeno. Por lo tanto, la propia activación de los linfocitos T en la respuesta inmune normal da como resultado una inducción en la expresión de CTLA-4, que se acumula en la superficie del linfocito T, concretamente en la interfaz de la célula T-APC, alcanzando niveles suficientes para eventualmente bloquear la coestimulación y anular la respuesta de los linfocitos T para evitar el daño excesivo. [21, 22]

CTLA-4 en sí está sujeto a regulación, tal y como se explica en la figura adjunta.

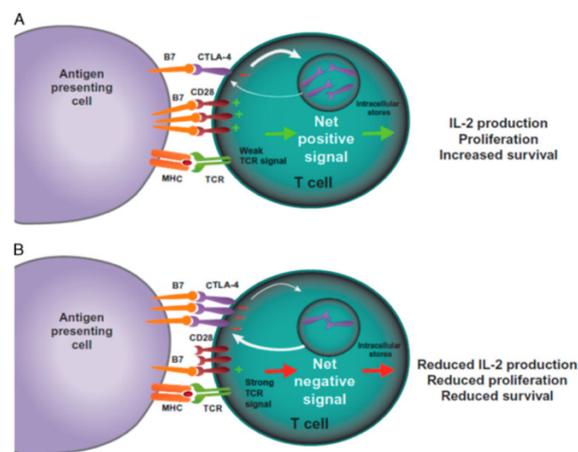


Figura 4. A, en el caso de un estímulo de TCR débil, predomina la unión a CD28/B7, lo que da como resultado una señal activadora neta positiva y por consecuencia producción de IL-2, proliferación y una mayor supervivencia de la célula T. **B**, en el caso de que el estímulo del TCR sea fuerte, la expresión de CTLA-4 se regula al alza. CTLA-4 compite con CD28 por la unión de moléculas B7. El aumento de la unión de CTLA-4/B7 puede dar como resultado una señal negativa neta, lo que limita la producción y proliferación de IL-2, y limita la supervivencia de la célula T. CTLA-4 indica antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; IL-2, interleucina-2; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; TCR, receptor de células T. [22]

CTLA-4 también está involucrado en otros aspectos del control inmune. Las ya mencionadas células T reguladoras (T-regs) controlan las funciones de los linfocitos T efectoras y, por lo tanto, son piezas clave en el mantenimiento de la tolerancia inmune. [13] Las T-regs expresan CTLA-4 de forma constitutiva, y se cree que esto tiene importancia en el desempeño de sus funciones supresoras. Un mecanismo por el cual

se cree que controlan a los linfocitos T efectores es la regulación negativa de los ligandos B7. [4,22]

La expresión constitutiva de CTLA-4 en T-regs puede secuestrar o causar la internalización de las moléculas B7 en las APC, por consecuente se produciría una falta en la señal coestimuladora CD28/B7 (por falta relativa de B7). La falta de coestimulación lleva a una disminución en la proliferación de los linfocitos T efectores. [22]

PD-1 es miembro de la misma familia de CD28 y CTLA-4 de receptores coestimuladores/inhibidores, aunque su función es similar a la de CTLA-4. También ejerce la función de “punto de control inmune” mediante el dominio ITIM inhibitor de su porción intracelular, al cual se asocia la tirosina fosfatasa SHP-2. Esta fosfatasa desfosforila moléculas de señalización de la vía de activación linfocitaria tras 24 horas desde la activación inicial del linfocito T mediada por reconocimiento del antígeno correspondiente a través del TCR. Esta desfosforilación tiene como consecuencia una alteración en la proliferación, supervivencia y función del linfocito T. Así es como el sistema inmune controla la respuesta linfocitaria excesiva. [4,19,22]

PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 (también conocido como CD274 o B7-H1), que es ampliamente expresado por muchas células somáticas principalmente tras la exposición a citocinas proinflamatorias y PD-L2 (también conocido como CD273 o B7-DC), que tiene una expresión más restringida en las células presentadoras de antígeno. Lo curioso de estas interacciones entre PD-1 sus ligandos es que los tumores tienen capacidad de expresar PD-L1. Las células T antitumorales, a través del TCR, reconocen constantemente los antígenos tumorales a medida que el cáncer avanza desde lesiones primarias a metastásicas. La activación del TCR resulta en la producción de citocinas proinflamatorias, incluido el interferón gamma (IFN- γ), que es el estimulador más fuerte para que se produzca la expresión reactiva de PD-L1 en las células tumorales. Esta expresión de PD-L1 inducida por inflamación en el microambiente tumoral da como resultado el agotamiento de células T, inhibiendo la respuesta de las células T citotóxicas antitumorales. Otra complejidad añadida a la ruta PD-1/PD-L1 es que PD-L1 puede servir como receptor de CD80 mediando así otra señal inhibitoria. [19,22,23]

Ambas vías inhibitorias pueden funcionar en diferentes etapas de la tolerancia de la respuesta inmune (inducción versus mantenimiento) y en diferentes sitios (órganos linfoides o tejidos diana). CTLA-4 ejerce efectos importantes durante el proceso inicial de activación células T en órganos linfoides porque CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) se expresan principalmente en los tejidos linfoides. Mientras que PD-1 puede regular estos procesos directamente en los tejidos donde se expresan sus ligandos. [23]

Si bien estos puntos de control inmunitario inhibitorios actúan como cortafuegos para prevenir la activación aberrante o crónica del sistema inmune y, por lo tanto, son críticos para el mantenimiento de la homeostasis inmune, pueden ser utilizados por células cancerosas o células presentadoras de antígeno asociadas a tumores (APC) como un medio para evitar la respuesta de las células T antitumorales y promover el escape

del tumor al sistema inmunitario. La inmunoterapia basada en los ICIs actúa a nivel de estas vías inhibitorias. [24]

4.1. Los ICIs y sus aplicaciones

Dependiendo de la vía sobre la que actúen los ICIs, podemos distinguir dos grupos principalmente, los anti CTLA-4 y los anti PD-1/PD-L1.

Alrededor de 1994 se demostró que la señalización mediada por **CTLA-4** restringe la actividad de las células T. A partir de entonces se comenzó a trabajar en la hipótesis de que la inhibición de esta molécula “inhibidora” podía convertirse en una nueva estrategia terapéutica en el cáncer, en combinación con otras terapias ya existentes en ese momento. [25]

En 2010, un estudio clínico de fase III realizado en pacientes con melanoma no resecable en estadio III/IV tratado previamente, mostró el primer resultado sorprendente de Ipilimumab®, un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CTLA-4 totalmente humano. Se observó que los pacientes tratados con este AcM, solo o en combinación con la vacuna peptídica gp-100 (Ag tumoral glicoproteína 100), mostraron una supervivencia mucho mayor que los pacientes tratados solo con vacunación con gp100.[26] Así mismo, en 2011 surgió otro estudio que comparaba del tratamiento con dacarbacina asociada a Ipilimumab con respecto a dacarbacina asociada a placebo en pacientes con melanoma metastásico. Este estudio apoyó los resultados prometedores previos mostrando mayor supervivencia a largo plazo en los pacientes tratados con terapia combinada con Ipilimumab. [27] Finalmente, Ipilimumab se convirtió en el primer ICI aprobado para la terapia contra el cáncer por la FDA de EE.UU en 2011 indicado como terapia adyuvante en pacientes con melanoma metastásico avanzado incluyendo el melanoma sometido a resección completa y linfadenectomía total de ganglios linfáticos regionales infiltrados por el tumor. [19, 24]

De hecho, un metaanálisis realizado en 2015 de 10 estudios prospectivos y 2 retrospectivos que evaluó la supervivencia a largo plazo de 1861 pacientes con melanoma avanzado estimó una tasa de supervivencia del 22% a los 3 años para los pacientes que recibieron terapia con ipilimumab extendiéndose la supervivencia en algunos pacientes hasta casi 10 años. [28]

Aunque actualmente solo está aprobado para el tratamiento del melanoma en monoterapia, el Ipilimumab se está investigando como tratamiento para una variedad amplia de otros tipos de cáncer, incluidos el carcinoma de células renales (CCR), el carcinoma no microcítico de pulmón (CPNM) o el cáncer de próstata, entre otros, aunque su eficacia en este tipo de tumores es limitada, pudiendo explicarse por la resistencia intrínseca de los tumores sólidos, atribuida a características como la baja inmunogenicidad de estos tumores y el microambiente tumoral inmunosupresor anteriormente comentado. [29]

Si bien Ipilimumab es actualmente el único inhibidor del punto de control inmunitario anti-CTLA-4 que ha recibido la aprobación de la FDA, Tremelimumab® es un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 IgG2 completamente humano que también se está investigando en ensayos clínicos. [19] Aunque no ha mejorado la supervivencia de los pacientes en monoterapia en ningún ensayo hasta la fecha, actualmente se está investigando en combinación con Durvalumab® (un inhibidor del punto de control inmunitario anti-PD-L1 del que hablaremos más adelante) para evaluar si tendrá una mayor eficacia como parte de regímenes combinatorios. [24]

Otro aspecto importante de CTLA-4 como “punto de control” era su relación con los T-regs. Los efectos de los fármacos anti-CTLA-4 en los T-regs todavía es tema de debate. De hecho, la unión de CTLA-4 por Ipilimumab en T-regs dentro del tejido tumoral tendría que promover el agotamiento de los T-regs por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis por células NK y macrófagos, pero recientemente se descubrió que tanto el Ipilimumab como el Tremelimumab, aumentan la infiltración de las células T CD4⁺ y T CD8⁺ dentro del tumor sin cambiar o agotar significativamente las células T-regs dentro del microambiente tumoral. [19, 30]

El Ipilimumab ha mostrado una respuesta claramente beneficiosa en clínica, pero la presencia de toxicidad asociada, sobre todo a los llamados irAE (por sus siglas en inglés *immuno-related Adverse Effects*), se ha convertido en un obstáculo que limita el espectro de pacientes que pueden beneficiarse de estos tratamientos. [29] Pacientes tratados con Ipilimumab mostraron un aumento importante de las subpoblaciones de células T y la aparición de eventos adversos frecuentes y diversos relacionados con el sistema inmune que involucraron daño en intestino, piel, glándulas endocrinas, hígado entre otros órganos. [26, 31]

Por otro lado, está la terapia **anti-PD-1 y anti-PD-L1**. Aunque PD-1 se descubrió antes que CTLA-4 en 1992 como una molécula asociada con la muerte programada de las células T, no se advirtió su papel en la regulación negativa de las células T hasta varios años después, cuando se observó la presencia de enfermedades autoinmunes en ratones transgénicos en los que se había anulado la expresión de PD-1 en los linfocitos T. [32] Casi al mismo tiempo se descubrieron sus correspondientes ligandos PD-L1 y PD-L2. [24,29]

Como ya mencionaba en el apartado anterior, mientras que la inducción de la expresión de CTLA-4 ocurre en fases iniciales de la activación linfocitaria en los órganos linfoides, la interacción de PD-1 con sus ligandos ocurre en una fase más tardía principalmente en tejidos y órganos periféricos, tras la presentación de antígenos a las células T de memoria. Por lo tanto, las terapias anti-PD-1 y anti-PD-L1 al dirigirse más específicamente a las células T que ya están involucradas en una respuesta efectora en curso, tendrán un espectro más restringido y específico sobre las células T antitumorales, lo que resulta en una mayor actividad terapéutica y una toxicidad más limitada en comparación con el bloqueo de CTLA-4. [19, 31]

Estos descubrimientos llevaron a una mayor explotación de estas terapias con la consecuente aprobación de un mayor número de fármacos en comparación con las terapias anti-CTLA-4. Actualmente hay cinco anticuerpos monoclonales anti-PD-1 o anti-PD-L1 aprobados por la FDA en 11 indicaciones diferentes de cáncer. [19]

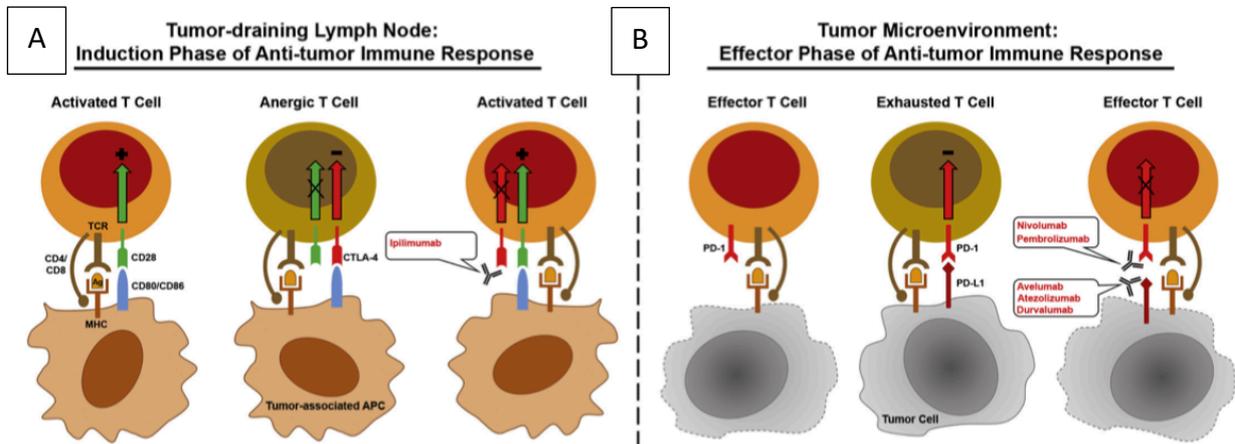


Figura 5. A) La acción de CTLA-4 en las células T en los ganglios linfáticos durante la fase de inducción de la respuesta inmune antitumoral, impide la activación de las células T desde fases iniciales. B) Las células T antitumorales que consiguen adquirir funciones efectoras citolíticas pueden experimentar una regulación negativa adicional en una fase más tardía, durante su encuentro con células tumorales o APCs que estén expresando PD-L1 en el microambiente tumoral. [24]

El Nivolumab, un anticuerpo monoclonal IgG4k completamente humano, surgió como la primera opción terapéutica anti-PD-1 para el cáncer. Se administró por vez primera a pacientes en octubre de 2006 en un ensayo de fase 1 realizado en pacientes con diversos tipos de cáncer avanzado y refractario a las terapias convencionales. Los resultados mostraron que el 37.5% de los pacientes presentaron respuesta tumoral objetiva, incluidos pacientes con melanoma, carcinoma de células renales y cáncer no microcítico de pulmón (CPNM). [33]

Tras estos resultados prometedores un número importante de estudios fueron llevados a cabo para el Nivolumab y finalmente en 2014 fue aprobado por la FDA convirtiéndose en el primer agente anti-PD-1 para el cáncer. [19,24] Poco después, en 2015, fue aprobado también como terapia para el cáncer no microcítico de pulmón avanzado (CPNM). Además de su eficacia en el tratamiento del melanoma y el CPNM, ensayos de fase III realizados en pacientes con carcinoma avanzado de células escamosas de pulmón (CPCE), carcinoma renal avanzado y carcinoma recurrente de células escamosas de cabeza y cuello han demostrado resultados beneficiosos con Nivolumab en cuanto a supervivencia, en comparación con terapias convencionales. [34,35] Estos resultados condujeron a su aprobación como terapia de primera o segunda línea para diversas indicaciones de estos cánceres en años posteriores. Además, Nivolumab obtuvo recientemente aprobación para el tratamiento del carcinoma

urotelial avanzado, el carcinoma hepatocelular avanzado (CHC) y el cáncer colorrectal con alta inestabilidad de microsatélites. [36-38].

Algo destacable es que Nivolumab fue el primer ICI aprobado para el tratamiento de una neoplasia hematológica, el linfoma de Hodgkin, las tasas de respuestas en este tipo de neoplasia fueron de las más altas llegando a ser de hasta el 65%. [24] Así mismo se convirtió también en pionero en el tratamiento del cáncer microcítico, recibiendo aprobación de la FDA como tercera línea de tratamiento de este en 2018. Esta aprobación se basó en datos de un estudio de fase 1/2 que evaluaba Nivolumab en pacientes que habían experimentado progresión de la enfermedad después de haber recibido quimioterapia basada en cis-platino y al menos otra línea de terapia. En una media de seguimiento de 28,3 meses, la tasa de respuesta objetiva fue del 11,9% (IC 95%: 6,5–19,5) con una media de duración de la respuesta de 17,9 meses. A los 6 meses, el 17,2% de los pacientes no habían progresado y las tasas de supervivencia global a 12 y 18 meses fueron 28.3% y 20.0%, respectivamente. [39]

Prácticamente de forma simultánea, otro inhibidor de PD-1, Pembrolizumab un AcM IgG4 anti-PD-1 completamente humanizado recibía aprobaciones muy similares a las de Nivolumab. Los datos clínicos alentadores de Nivolumab, permitieron el desarrollo clínico de Pembrolizumab como terapia centrada en pacientes con melanoma, siendo aprobado como terapia de primera línea para el melanoma no resecable o metastásico en 2015 por la FDA. [19] Algo similar ocurrió con la aprobación de Pembrolizumab en el tratamiento del cáncer no microcítico de pulmón metastásico, fue el primer ICI indicado como terapia de primera línea para el tratamiento de este tipo de tumores, para el cual fue aprobado en 2016 como monoterapia alternativa a la quimioterapia. Así mismo Pembrolizumab recibió aprobación completa para el tratamiento de linfoma de Hodgkin clásico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma urotelial, adenocarcinoma de unión gastroesofágica y cáncer colorrectal. [24]

Es importante destacar que esta clase de agentes fue la primera en recibir la aprobación de la FDA basada únicamente en una característica genética de los tumores independientemente del lugar de origen, ya que Pembrolizumab también fue aprobado para el tratamiento de neoplasias con alta inestabilidad de microsatélites en 2017 junto a Nivolumab. [19,24, 38]

En los últimos 2 años Pembrolizumab ha recibido aprobaciones para el tratamiento de muchas otras neoplasias ampliando de forma importante el espectro de actuación de los ICIs. Pembrolizumab ha ampliado sus aprobaciones para el tratamiento del CPNM, recibiendo aprobación para el subtipo histológico escamoso en combinación con quimioterapia [40] y para el tratamiento del cáncer escamoso de cabeza y cuello, para el que ha pasado a ser opción como terapia de primera línea. [41] Así mismo, recibió aprobación para el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico, sumándose a Nivolumab aunque ambos lo hicieron como terapia de tercera línea. [42]

Pembrolizumab también se ha convertido en el primer ICI aprobado para el tratamiento de neoplasias ginecológicas, recibiendo aprobación como tratamiento en el cáncer de cérvix recurrente o metastásico previamente tratado, ofreciendo una nueva opción como tratamiento de segunda línea en pacientes con este tipo de cáncer. De la misma forma hace apenas unos meses recibió aprobación para el tratamiento del carcinoma endometrial en pacientes que presentan progresión de la enfermedad tras recibir terapia sistémica previa y que no son candidatas a cirugía curativa o radiación. Los estudios realizados en las pacientes demostraron una TRO (tasa de respuesta objetiva) de 12.0% y 39.6% respectivamente en las pacientes tratadas con Pembrolizumab. [43,44]

En 2018, recibió aprobación para una segunda neoplasia hematológica, un subtipo de linfoma no Hodgkin, el linfoma primario mediastínico difuso de células B grandes, que afecta principalmente a mujeres jóvenes y es el subtipo más común de linfoma no Hodgkin en Estados Unidos. La aprobación se basaba en dos estudios que demostraron respuestas tanto en pacientes con linfoma primario refractario como en pacientes que habían recaído tras terapias previas, con TRO de 48% y 45% en ambos estudios respectivamente e incluso con el 33% y 13% de respuestas completas. [45]

A esta lista de aprobaciones se suman, el carcinoma de células de Merkel, el carcinoma hepatocelular, el carcinoma de células renales y por último en enero de 2020 se sumó el carcinoma de vejiga no invasivo del músculo, de alto riesgo y no reactivo a BCG. En estos tumores pembrolizumab demostró una respuesta completa en el 41% de los pacientes con una media de duración de respuesta de 16.2 meses. [46-49]

Además de interrumpir las rutas inhibitorias a través del bloqueo de los receptores PD-1, el bloqueo de **PD-L1** con ICIs también ha demostrado ser útil para mejorar la actividad efectora de las células T antitumorales. [24]

El primer anticuerpo **anti-PD-L1** fue Atezolizumab, anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humanizado que fue aprobado por la FDA en 2016 para el tratamiento de cáncer urotelial con progresión tras tratamiento previo [19]. Así mismo los estudios llevados a cabo con el Atezolizumab en este tipo de tumores pusieron a la vista que los resultados obtenidos eran diferentes según el subtipo de paciente, encontrándose respuestas más altas en los pacientes con altos niveles de expresión de PD-L1, así como en pacientes que presentaban una carga mutacional del tumor más alta [50, 51]. Estos resultados indicaron que el nivel de mutaciones acumuladas en el tumor y el nivel de expresión de PD-L1 de las células inmunes infiltrantes dentro del tumor puede usarse para seleccionar una población de pacientes más adecuada para la terapia anti-PD-L1. [29] Con indicaciones similares para el cáncer no microcítico de pulmón, Atezolizumab ha demostrado ser superior a la quimioterapia, lo que resulta en tasas de supervivencia general más altas que las alcanzadas con Docetaxel, [52] siendo aprobado también por la FDA para este tipo de tumores un tiempo después incluso como tratamiento de primera línea. [53]

Atezolizumab ha abierto nuevos caminos para el tratamiento de neoplasias no tratadas con los ICIs anteriormente mencionados. Fue pionero como tratamiento de primera línea del carcinoma urotelial de vejiga avanzado en pacientes no aptos a quimioterapia, en el tratamiento del cáncer de mama y como tratamiento de primera línea, en combinación con quimioterapia, del cáncer microcítico de pulmón (ya que como comentaba anteriormente, los anti-PD-1 aprobados hasta el momento para este tumor lo hacían como tratamiento de tercera línea). [54-56]

En pacientes con cáncer de mama en tratamiento con Atezolizumab, la respuesta fue mejor en los casos expresaban altos niveles de PD-L1, igual a lo observado en el cáncer urotelial. No obstante, el estudio que sirvió como base para la aprobación de este AcM en el tratamiento del carcinoma microcítico de pulmón, no se demostró una relación entre la carga mutacional tumoral y la respuesta clínica. Estos resultados contrastan con los estudios previos en los que sí que relacionaba la carga mutacional tumoral con una mayor respuesta. Una posible explicación de esta falta de beneficio en el subgrupo de pacientes mencionado es que en este ensayo se utilizó la combinación de cis-platino y etopósido, que es muy activa y altamente mielosupresora. [54-56]

Otro ICI anti-PD-L1 empleado es el Avelumab®, un anticuerpo monoclonal IgG1λ completamente humano, que también se ha probado en varios tipos de tumores. El primer tipo de cáncer en el que se probó Avelumab fue el carcinoma metastásico de células de Merkel. El tratamiento con Avelumab logró respuestas objetivas en 31.8% de los pacientes, y el 28.6% de los respondedores lograron respuestas completas. [57] De esta forma, se convirtió en el primer tratamiento aprobado por la FDA para el carcinoma de células de Merkel metastásico en marzo de 2017. Así mismo, Avelumab recibió aprobación para el tratamiento del carcinoma urotelial metastásico recurrente tras tratamiento previo con quimioterapia. [24,29]

En el último año ha recibido aprobación de la FDA como tratamiento de primera línea del cáncer renal avanzado de células claras en combinación con Axitinib (inhibidor de la tirosin quinasa asociada a los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3)). Los pacientes que recibieron una combinación de Avelumab más Axitinib tuvieron una supervivencia libre progresión más larga (13.8 vs 8.4 meses) y una tasa de respuesta objetiva más alta (51.4% vs 25.7%) que aquellos que recibieron Sunitinib. [58]

Ensayos recientes con otros anticuerpos anti-PD-L1 como Durvalumab®, un anticuerpo monoclonal IgG1κ completamente humano, han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de cáncer avanzado de vejiga y en el cáncer no microcítico de pulmón (CPNM). Recibió aprobación para el cáncer urotelial de vejiga previamente tratado en 2017, el estudio en el que se basó esta aprobación mostraba mayores beneficios en la TRO en relación con niveles altos de expresión de PD-L1 26.3% vs 4.1% en pacientes con expresión baja de PD-L1, aunque hubo evidencia de respuesta en ambos grupos. [59] Hace apenas 2 años, en febrero de 2018, Durvalumab fue aprobado para el tratamiento del CPNM en estadio III no resecable sin progresión

evidente tras tratamiento previo con quimioterapia tras demostrarse un impacto en la supervivencia sin progresión a 18 meses en pacientes que recibieron este AcM versus placebo (44.2% vs 27.0%). [60] Muy recientemente (marzo 2020), Durvalumab ha sido aprobado por la FDA como tratamiento de primera línea para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas extendido no reseccable. Durvalumab fue probado en un ensayo, abierto, aleatorizado de fase 3, en el cual los pacientes recibían Durvalumab asociado a quimioterapias estándar (etopósido más carboplatino) frente a pacientes que recibían únicamente quimioterapia estándar. Se demostró una mejoría significativa en la supervivencia general, siendo la mediana de supervivencia global de 13.0 meses (IC 95% 11.5–14.8) en el grupo recibiendo Durvalumab más quimioterapia versus 10.3 meses (IC 95% 9.3–11.2) en el grupo con quimioterapia sola. [61] [24,29]

4.2. Los retos de los ICIs: terapias combinadas, toxicidad y resistencia.

4.2.1. Terapias combinadas

En los pacientes con cáncer, los beneficios clínicos de las terapias consistentes en el bloqueo de los puntos de control, dirigidas a la vía CTLA-4 o a la vía PD-1/PD-L1, han supuesto un notable avance. Sin embargo, aún existe un amplio margen de mejora. Por ello, y dado que ambas vías inhibitoras de los puntos de control regulan la función de los linfocitos T de forma no redundante y mediante mecanismos que actúan en vías particulares y en distintos momentos de la diferenciación de los linfocitos T (Figura 5), se ha pensado que la combinación de terapias que inhiban ambas vías podría incrementar los ratios de mejoría clínica. Además, estudios preclínicos realizados en modelos con ratones habían demostrado la eficacia de las terapias combinadas. [19,24]

En diciembre de 2009 se comenzó el primer estudio de terapia combinada, usando Ipilimumab (anti-CTLA-4) y Nivolumab (anti-PD-1). La sinergia entre ambos AcMs ha mostrado respuestas sin precedentes en pacientes con melanoma metastásico y se aprobó en 2015 su empleo en pacientes con melanoma de tipo salvaje con la mutación BRAF V600. Un año más tarde se amplió su utilización, desligándola de la existencia o no de mutación de BRAF. [19,24]

Un estudio que muestra el seguimiento clínico en pacientes con melanoma metastásico, comparando regímenes de monoterapia con Nivolumab, monoterapia con Ipilimumab y la combinación de los ambos, mostró tasas generales de supervivencia del 58% a los 3 años en pacientes que recibieron terapia combinada de ICIs, en comparación con el 52% en pacientes que recibieron solo Nivolumab y el 34% en pacientes que recibieron solo Ipilimumab. Del mismo modo, la tasa de supervivencia libre de progresión a los 3 años fue del 39% en el grupo de tratamiento con Ipilimumab + Nivolumab, en comparación con el 32% y el 10% en los grupos tratados con monoterapia con Nivolumab o Ipilimumab respectivamente. [24,63]

El primer estudio dirigido a identificar qué pacientes se beneficiarían más de la terapia combinada, ha buscado su relación con el nivel de expresión de PD-L1 en el tumor. Este estudio muestra que los pacientes con melanoma avanzado con poca o ninguna expresión de PD-L1 (<1%) se benefician más de la terapia combinada, en comparación con la monoterapia con Nivolumab solo, ya que les beneficia en este caso la terapia anti CTLA-4. [63]

Esta misma combinación ha sido aprobada también para el tratamiento del cáncer de células renales de riesgo bajo o intermedio en pacientes no tratados previamente. La combinación demostró un aumento significativo en la supervivencia general en comparación con sunitinib. Se observó un beneficio de supervivencia global en este caso independientemente del nivel de expresión de PD-L1. [64] Pocos meses después fue aprobado también para el tratamiento de pacientes mayores de 12 años con cáncer colorrectal metastásico con inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H) o con alteraciones del MMR (mismatch repair) que ha progresado después del tratamiento previo. [65]

Los primeros ensayos en pacientes con CPNM avanzado y CPM recurrente también han demostrado resultados prometedores para el tratamiento combinado de Ipilimumab + Nivolumab. Aunque los resultados en los siguientes estudios de fase 2 en el tratamiento del CPNM siguen siendo positivos [66], no ha ocurrido lo mismo en el estudio de fase 3 checkmate 451, para el tratamiento del CPM (NCT02538666). [24]

También se han probado otras formas de terapias combinadas con otros ICIs, como Pembrolizumab + Ipilimumab, observándose resultados parecidos a la combinación Ipilimumab + Nivolumab en el tratamiento del melanoma. [67] Así mismo la combinación Durvalumab + Tremelimumab, mostró resultados prometedores en estudios iniciales (fase Ib) en el tratamiento del CPNM. [68] Recientemente se han reportado resultados positivos en supervivencia libre de progresión, en un estudio de fase III con esta combinación. El ensayo mostró una mejoría clínica estadísticamente significativa en el análisis final de supervivencia libre de progresión en pacientes tratados con la combinación triple de Durvalumab más Tremelimumab y quimioterapia frente a la quimioterapia sola (NCT03164616). [24]

4.2.2. Toxicidad relacionada con el uso de ICIs.

Si bien es cierto que hasta ahora se ha logrado un notable beneficio clínico con la aplicación de inmunoterapia basada en ICIs, algo importante a tener en cuenta es la presencia de efectos adversos con estas terapias. La preocupación por lo que se conoce como irAE (eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario) ya surgió durante los primeros ensayos con ICIs. El hecho de que estos fármacos no se dirijan selectivamente a las células T específicas del tumor implica el riesgo de que la respuesta inmunitaria antitumoral deseada venga acompañada de la activación involuntaria de respuestas inmunitarias no específicas del tumor dirigidas a autoantígenos expresados

en los tejidos sanos. Se ha informado que tales irAEs ocurren en una amplia variedad de órganos tras la utilización de los ICIs. [24]

El espectro de irAEs se expande desde las manifestaciones más comunes, como los efectos dermatológicos, gastrointestinales y endocrinos, a presentaciones más raras que involucran a los sistemas nervioso, hematopoyético y urinario. Los irAEs, teóricamente, pueden afectar a cualquier tejido susceptible de ser infiltrado por células del sistema inmunitario. Por ejemplo, el Ipilimumab (anti-CTLA-4), se asocia con tasas más altas de toxicidad gastrointestinal, prurito, erupción cutánea e hipofisitis, mientras que el uso de antagonistas PD-1 / PD-L1 se asocia con un mayor riesgo de vitiligo, distiroidismo, hepatotoxicidad y neumonitis. [69]

La incidencia de algún tipo de irAE oscila entre el 15 y el 90% de los pacientes en los ensayos con ICIs en monoterapia. [26,35] Se estima que la tasa de irAEs graves que requieren tratamiento inmunosupresor y retirada del AcM ICI oscila entre el 0,5 y el 13%. [69]

Además, se evidenció que la incidencia de irAEs era mayor en pacientes tratados con inhibidores de CTLA-4 que en aquellos en que se usaron inhibidores de PD-1/PD-1L, posiblemente por el mecanismo de acción más específico de estos últimos en el ambiente tumoral, como ya se ha explicado. (Figura 5). También se demostró que las complicaciones más severas (grado 3 o mayor) fueron más frecuentes con el empleo de terapias combinadas (53-54%) que con la monoterapia (18-24% en pacientes tratados solo con anti-PD-1), posiblemente por desregular la respuesta inmunitaria a varios niveles sucesivos. [63,70,71]

Aunque los agentes anti-PD-1/anti-PDL-1 pueden ser menos tóxicos que los agentes anti-CTLA-4, el enfoque para manejar los irAEs producidos en ambos tipos de terapia es similar. La mayoría de los irAEs son leves (de grado 1-2) y remiten con tratamiento esteroideo, siendo solo una minoría los que requieren tratamiento inmunomodulador (anti-TNF) o cirugía. [69]

A pesar de la importancia de este problema y la necesidad de manejar la toxicidad asociada a la terapia con ICIs, sin comprometer los efectos antitumorales deseables, la seguridad general, la tolerabilidad y la baja tasa de interrupción del tratamiento en pacientes sigue teniendo una relación riesgo-beneficio superior al tratamiento con quimioterapia. [24]

4.2.3. Resistencia a la terapia con ICIs.

La eficacia y el alcance de la terapia con ICIs se encuentran con muchos desafíos. Además de los irAEs, anteriormente comentados, estas terapias se encuentran con el escollo de la aparición de resistencias. [24]

A diferencia de las terapias que emplean como diana a moléculas implicadas en vías oncogénicas, cuya eficacia terapéutica dura hasta que el cáncer desarrolla una

nueva forma de reactivar la vía oncogénica, la tasa de recaída con las modalidades de inmunoterapia es menor. Se esperaba que los ICIs pudieran inducir respuestas duraderas, debido a la capacidad de las células T de adquirir memoria y de producir una respuesta policlonal. Sin embargo, se han convertido en un problema importante tanto las resistencias primarias como las secundarias, tras un período inicial de respuesta. [19,24]

En algunos casos, la falta de respuesta inicial (primaria) puede deberse al hecho de que muchos pacientes con cáncer metastásico ya han sido tratados previamente con terapias tradicionales. La evolución de tumores agresivos y su influencia potencialmente negativa sobre las células inmunitarias en el momento en que dichos pacientes reciben los ICIs, puede impedir cualquier respuesta significativa a esta terapia.

Otra limitación fundamental de la terapia con ICIs se basa en que su eficacia se fundamenta en la preexistencia de una inmunidad antitumoral que los ICIs puedan reactivar, y muchos pacientes carecen de cualquier tipo de respuesta previa antitumoral. Lo más común en estos casos es la ausencia de TILs (linfocitos infiltrantes del tumor) poniendo de manifiesto que el tumor es muy poco inmunogénico, generalmente por una baja carga mutacional. En 2014, el análisis de secuenciación del exoma completo en muestras tumorales de pacientes tratados con Ipilimumab o Tremelimumab identificó que la carga mutacional estaba directamente relacionada con beneficio clínico en pacientes con melanoma metastásico. [19, 24, 25]

Si contamos con que el tumor tiene una inmunogenicidad adecuada, el siguiente paso por el que puede evadir la respuesta inmunitaria y ser refractario al tratamiento con ICIs es el ya explicado **immunoediting**. Para recordar, este proceso de immunoediting puede provocar la pérdida de las mutaciones que son más inmunogénicas en el tumor o bien provocar disminución en la expresión de genes involucrados en la vía de presentación del antígeno.

Se ha demostrado que la delección específica en alelos de las moléculas HLA encargadas de presentar neoantígenos o la pérdida de β_2M puede producir resistencias. [19, 25].

Sin embargo, una carga mutacional alta no siempre garantiza una respuesta favorable a los ICIs. Se observaron mutaciones de pérdida de función en Janus quinasas JAK1 y JAK2 en pacientes que no mostraron respuesta al Pembrolizumab. Como ya hemos ido explicando, la última ruta que influye en el proceso de evasión tumoral es la expresión de PD-L1 por parte del tumor al detectar el ataque por parte de células T. Esta expresión de PD-L1 está mediada por la producción de IFN- γ . Se demostró que el IFN- γ liberado por las células T produce activación de Janus quinasas JAK1 y JAK2 en las células tumorales, lo que desemboca finalmente en expresión de PD-L1. Por lo tanto, cualquier pérdida, tanto en el receptor de IFN- γ como en la ausencia de cualquiera de las kinasas, llevaría a una falta de la expresión de PD-L1 por parte de la célula, haciendo inútil el tratamiento inhibitor. [19,25,72]

Finalmente, incluso en los casos en que los tumores permanecen inherentemente sensibles al IFN γ , la acumulación de factores metabólicos e inmunosupresores adicionales en el microambiente del tumor, como la indoleamina-2,3-dioxigenasa y el TGF β , entre otros pueden limitar la eficacia de los ICIs de forma aislada.

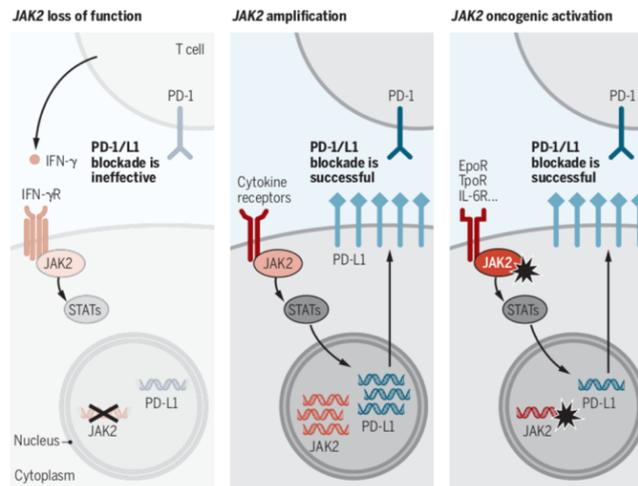


Figura 6. (Izquierda) Tumores con mutaciones en la ruta mencionada, tendrán expresión reducida de PD-L1 con lo que la terapia con anti PD-1/PD-L1 será ineficaz. (Medio) En el linfoma de Hodgkin y el linfoma mediastínico de células B grandes, la amplificación JAK2 produce una alta expresión de PD-L1, lo cual apoya el uso de inhibidores del punto de control inmunitario. En las neoplasias mieloproliferativas (derecha), la activación de JAK2 mediante el oncogén V617F promueve la expresión de PD-L1, que proporciona sensibilidad al bloqueo de PD-1 / PD-L1. [72]

También vale la pena señalar que la terapia con ICIs en la clínica se ha focalizado hasta ahora en los inhibidores del punto de control dirigidos a CTLA-4, PD-1 y PD-L1. En los últimos años se han identificado otras vías de control inmunitario que podrían representar objetivos adicionales para monoterapia o terapias combinadas con otros ICIs. Algunos de estos puntos de control son:

I) LAG3 (Lymphocyte-activation gene 3) cuyo ligando principal son las moléculas MHC de clase II. Cuando LAG3 se expresa en los linfocitos T activados o en los linfocitos T-regs se une a moléculas MHC de tipo II y esto tiene dos tipos de consecuencias: (a) en las células T-efectoras transduce una señal inhibitoria; (b) en las T-regs aumenta su la actividad supresora. Por lo tanto, la inhibición de LAG3 podría reactivar la respuesta antitumoral de los linfocitos T.

II) TIM-3 (T-cell immunoglobulin mucin-3) es otra molécula de superficie involucrada en el agotamiento de las células T. Primero se demostró que TIM-3 está implicada en la falta de respuesta de los linfocitos T en la inflamación crónica. Tras la interacción con galectina-9 u otros ligandos desconocidos, los linfocitos T que expresan TIM-3 sufren apoptosis y pierden sus funciones efectoras. El posterior análisis mostró

que en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) la expresión de TIM-3 estaba regulada al alza en pacientes con melanoma y NSCLC;

III) TIGIT (T-cell immune receptor with immunoglobulin ITIM domain) también está implicado en la inhibición de la activación de células T. La expresión de TIGIT está estrechamente regulada en los linfocitos, especialmente en los T-regs y TCD8⁺, es un marcador fenotípico de las células T CD8⁺ no funcionantes, así mismo, media la supresión a través de T-regs, de otras células efectoras. [24,25]

5. Nuevas formas de inmunoterapia con células T.

Como ya hemos visto, las células T reactivadas adecuadamente están demostrando ser la herramienta inmunitaria más eficaz frente al cáncer. La inmunoterapia con linfocitos T basa su eficacia en la capacidad de estas células para destruir las células tumorales.

Una de las formas de inmunoterapia con células T en el cáncer, es la **terapia celular adoptiva** (ACT, adoptive cell transfer). De forma simplificada, la ACT es un tipo de inmunoterapia personalizada consistente en extraer células inmunitarias del propio paciente con cáncer, expandirlas in vitro en grandes cantidades y re-infundirlas nuevamente en el paciente para conseguir una erradicación del tumor. [73]

5.1. Terapia con TILs (linfocitos infiltrantes de tumor).

Los primeros intentos de aplicar esta estrategia terapéutica se hicieron aislando linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). La explicación para la aplicación de esta terapia se remonta a 1980, cuando se demostró actividad antitumoral de TILs in vivo en modelos de ratones. [74]

La terapia TIL actual consiste en la expansión ex vivo de TILs, a partir de material tumoral resecado, y la posterior transfusión al paciente de estos TILs en grandes cantidades. Previo a la infusión, el paciente es sometido a un régimen preparatorio de depleción de linfocitos mediante quimioterapia no mieloablativa (NMA) la cual consiste en 2 días de tratamiento con ciclofosfamida intravenosa, seguida de 5 días con fludarabina. Tras la infusión de TILs, los pacientes reciben una dosis alta de interleukina-2 (IL-2) por vía intravenosa. Así mismo, se cree que el apoyo posterior con IL-2 mejora aún más la duración del efecto terapéutico y la eficacia clínica de la terapia con TILs. Esta depleción de los linfocitos endógenos causa una linfopenia y neutropenia breves pero intensas, con una recuperación completa de la médula ósea en 7-10 días, que no requieren soporte de células madre hematopoyéticas. El objetivo de esta estrategia de linfodepleción es crear un espacio físico para la recepción de los TILs expandidos ex vivo. Así mismo, resulta en una menor competencia por las citocinas homeostáticas IL-7 e IL-15 y contribuye a eliminar poblaciones inmunosupresoras linfoides y mieloides. [75]

La ACT con TILs específicos se ha utilizado en su mayor parte en pacientes con melanoma desde hace más de 20 años. Esta aplicación en los melanomas está fundada en la base de que los melanomas a menudo presentan una gran infiltración de TILs. De hecho, la infusión de TILs en pacientes con melanoma metastásico producía respuestas completas y duraderas. [76] Por otra parte se han observado respuestas clínicas prometedoras en pacientes con melanoma uveal metastásico, con tasa de respuesta objetiva de hasta 35%, lo que puede convertirse en la primera opción terapéutica para pacientes con este tipo de melanoma para el que actualmente no existe tratamiento. [73,75]

En cuanto a la terapia con TILs en otros tumores sólidos, resultados más recientes muestran cierto éxito terapéutico en el cáncer de células renales, el cáncer de mama y el cáncer de cervix. [77-79] En general, la actividad anti-tumoral de los TILs en estos tumores es menor en comparación con el melanoma, debido a la mayor heterogeneidad en la carga mutacional. Actualmente, se está llevando a cabo un estudio clínico de fase II en pacientes con diversos tumores metastásicos, incluidos cánceres del tracto digestivo, mama, urotelio, ovario y endometrio, con el fin de proporcionar información sobre las tasas de regresión tumoral cuando se tratan con TILs. [75, 80]

No obstante, el uso de esta terapia no ha tenido una gran implantación, debido principalmente a dificultad para obtener TILs específicos del tumor en muchos tipos de cáncer. Al ser una inmunoterapia personalizada, los TILs de infusión deben producirse ex vivo de manera individualizada para cada paciente, y, por lo tanto, los costes son relativamente altos. Cabe destacar que esta terapia no supone en sí un aumento de la capacidad global del propio sistema inmune para combatir el cáncer, si no que es una terapia en la que se ataca al tumor de forma exógena. [73,80]

En general, el tratamiento con TILs muestra grandes posibilidades como terapia antitumoral en el melanoma y posiblemente también en otros tumores sólidos. Sin embargo, la terapia con TILs aún no ha sido aprobada como tratamiento debido a la falta de resultados suficientemente convincentes en ensayos clínicos prospectivos. No obstante, estrategias para potenciar su uso ya se están investigando. Un ejemplo son las terapias combinadas con ICIs. Se ha demostrado que el tratamiento con ipilimumab (anti-CTLA-4) aumenta la infiltración de linfocitos T en melanomas y amplía la actividad de los TILs en estos tumores. [81]

Por otro lado, los rápidos avances en los diferentes campos de terapia genética, edición de genes, biología de células T e identificación de *targets* específicos, han hecho posible la modificación genética de los linfocitos T, permitiendo que emerjan nuevas estrategias más efectivas. [73]

5.2. Terapia con TCRs

Concretamente, una alternativa al proceso dificultoso de aislamiento de TILs es aislar directamente de la sangre de los pacientes los **linfocitos T circulantes** y

modificarlos genéticamente en el laboratorio. De esta forma la extracción de los linfocitos es más sencilla, ya que no requiere que estos estén específicamente infiltrando el tumor y el abanico de neoplasias susceptibles de tratamiento se amplía, ya que no se requiere que sean tumores que contengan gran cantidad de TILs en su entramado celular.

Concretamente la terapia con TCRs se basa en codificar esos linfocitos T circulantes para que expresen TCRs transgénicos capaces de reconocer antígenos tumorales e inducir la muerte de las células cancerosas que expresan esos antígenos. Como sabemos la afinidad de los TCR “naturales” por estos antígenos tumorales es relativamente baja, lo que hace que la capacidad de reconocer y atacar tumores sea poco eficaz. Los TCR transgénicos, diseñados de forma artificial por tecnología de ingeniería genética, presentan alta avidéz por estos neoantígenos tumorales lo que mejora tanto la especificidad como la afinidad durante el reconocimiento de las células cancerosas por los linfocitos T. [73,82]

Los TCR son heterodímeros de cadenas alfa y beta que reconocen fragmentos de polipéptidos presentados por moléculas MHC. Los linfocitos T cuyo TCR se ha modificado pueden reconocer cualquier antígeno que puedan presentar las moléculas de MHC I, ya sea un antígeno intracelular, de superficie o un neoantígeno producido por las propias células tumorales. Por lo tanto, los TCR poseen una gran cantidad de *targets* potenciales. Así mismo, los linfocitos T con TCR modificado pueden activarse completamente aún cuando la cantidad de antígeno es escasa debido a que todas las moléculas auxiliares de la vía de transducción de señales del TCR naturalmente presentes en la vía tradicional se mantienen, lo que resulta en un efecto antitumoral potente. [82]

El diseño de TCRs de alta afinidad requiere la identificación de potenciales *targets* tumorales específicos. Primero, se identifica una gran cantidad de polipéptidos presentados por las células tumorales, y posteriormente se eliminan los que también son expresados en los tejidos normales. En la mayoría de los ensayos clínicos, los linfocitos T se obtienen mediante leucaféresis y su modificación genética se lleva a cabo mediante vectores gamma-retrovirales o lentivirales que incorporan los genes TCR en el genoma de los linfocitos del huésped, lo resulta en una expresión elevada del TCR introducido, por parte de estos linfocitos. Por último, se realiza una prueba de seguridad preclínica para garantizar efectos mínimos fuera de objetivo y mínima reactividad cruzada. Al igual que ocurría en la ACT con TILs, la mayoría de los protocolos clínicos de utilización de terapia génica con TRCs han incorporado el pre-acondicionamiento del paciente con régimen de linfodepleción previo a la infusión de los linfocitos TCR modificados. Como ya comentaba, esto facilita el injerto y amplía la vida útil de los linfocitos T infundidos. Además, también se ha utilizado la administración de IL-2 tras la infusión de células T. [75]

Todo este proceso es complejo y, de hecho, los primeros intentos llevaron a la utilización de TCRs poco específicos, de forma que las primeras terapias atacaban

antígenos que se expresaban de forma compartida en tejidos sanos. La primera evidencia de la potencia clínica de la terapia génica con TCRs fue dirigida al antígeno MART-1, este antígeno está presente en los melanocitos pero a su vez es expresado en aproximadamente el 80-95% de melanomas. Otros ejemplos fueron las moléculas gp100, CEA y MAGE-A3. Todas estas terapias mostraron perfiles de seguridad desfavorables, incluyendo toxicidad severa. [73, 75]

Por el contrario, modificaciones en diferentes aminoácidos permitieron llegar a un TCR de alta afinidad contra el antígeno NY-ESO-1. NY-ESO-1 al igual que MAGE-A3 es un antígeno de la familia cáncer/testículo (*C/T antigens*), los genes que codifican estos antígenos se expresan normalmente durante la embriogénesis, pero más adelante son silenciados. La excepción es la presencia de estos antígenos en los espermatozoides, así mismo los tumores a menudo re-expresan de forma aberrante estos genes y consecuentemente los antígenos cáncer/testículo, de ahí su nombre. NY-ESO-1 se encuentra sobre expresado hasta en el 52% de los melanomas, el 82% de los neuroblastomas, el 80-100% de los sarcomas sinoviales, el 43% de los tumores de ovario y de la misma forma el mieloma múltiple. Debido a su expresión restringida en tejidos normales, sumado a una expresión generalizada y elevada en diferentes tipos de cáncer, NY-ESO-1 se ha convertido en una diana idónea en la terapia génica con TCRs. Diferentes estudios han demostrado la eficacia de esta terapia, un estudio realizado en pacientes con mieloma múltiple mostró respuestas completas o parcialmente completas en el 70% de los pacientes. [83] También se han observado respuestas prometedoras en melanoma y sarcoma de células sinoviales, con respuestas clínicas objetivas del 55% y 60% respectivamente. [84] Estos resultados hacen probable que este TCR reactivo contra NY-ESO-1 sea el primer TCR transgénico aprobado por la FDA. [73,75,82]

Aunque la terapia con TCRs tiene un gran potencial, los protocolos actuales para su fabricación son costosos y laboriosos. Una de las limitaciones más importantes de los TCRs es que son dependientes de la presentación del neoantígeno tumoral objetivo por parte del complejo MHC I, que como ya ha sido comentado a lo largo de esta revisión, a menudo se encuentra regulada negativamente en las células tumorales como parte de un mecanismo de evasión tumoral a la respuesta inmunitaria. Además, existe riesgo de que se produzca un *missmatch* entre cadenas exógenas y endógenas (presentadas por células del tejido sano), lo que puede inducir el reconocimiento nocivo de autoantígenos, pudiendo llegar a producir enfermedad de injerto contra huésped. Encontrar solución a estos problemas es ahora mismo clave para el éxito de estas terapias. [73,82]

5.3. ¿Qué son las CAR T cells?

La terapia con CAR-T cells es la técnica de inmunoterapia anti-tumoral más novedosa. Esta terapia puede superar algunos de los desafíos presentados por las terapias de infusión de TILs y las terapias con TCRs.

La terapia CAR, un proceso muy similar al utilizado en la terapia con TCRs, consiste en modificar genéticamente los linfocitos T *in vitro*. Tras la extracción de los linfocitos T circulantes del paciente mediante leucoferesis, y usando un virus como vector, se codifican en ellos receptores específicos de superficie, llamados receptores quiméricos de antígeno, o *CAR* (por sus siglas en inglés, *chimeric antigen receptor*). A diferencia de los TCRs transgénicos, los CAR son moléculas completamente sintéticas que permiten que las células T se unan directamente, de forma específica, a un antígeno concreto de las células tumorales. Las células T, transfectadas para expresión del CAR específico del antígeno diana tumoral, se "expanden" en gran cantidad *in vitro* mediante cultivo con citocinas. El paso final es la infusión en el paciente de estas CAR T. Al igual que en la ACT con TILs y con TCRs, los pacientes reciben quimioterapia como pre-acondicionamiento linfodeplecionante. El fármaco más utilizado para este tratamiento es la ciclofosfamida, usándose también otros medicamentos como fludarabina, gemcitabina, lenalidomida y docetaxel. [82]

Cabe destacar que la terapia con CARs es más específica y más personalizable porque el dominio de unión al antígeno de los CAR se puede diseñar para atacar a varios *targets* tumorales. Además, las CAR-T cells también son capaces de establecer memoria. [82]

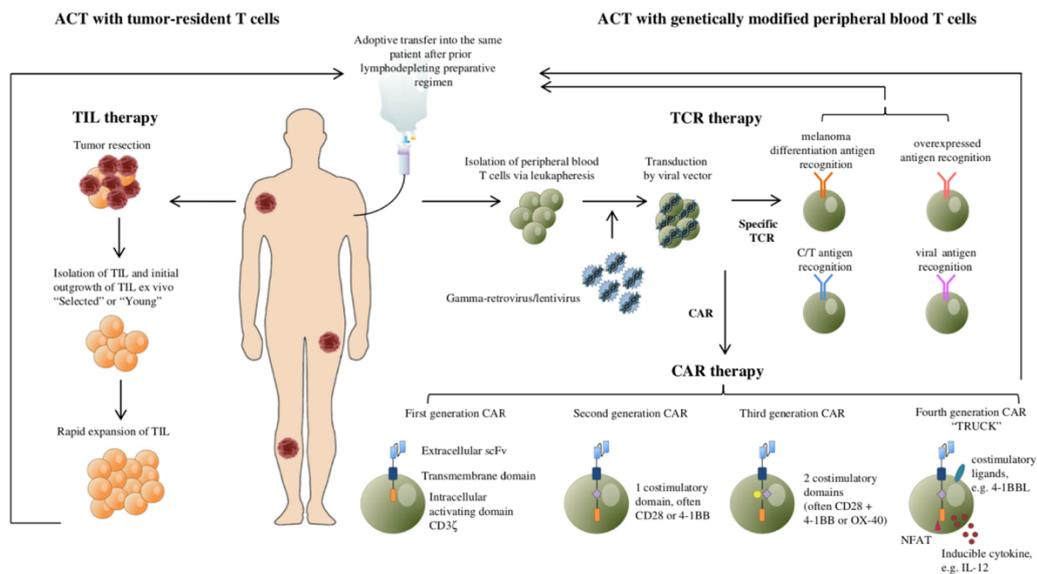


Figura 7. Descripción general esquemática de los procesos de ACT: terapia con linfocitos infiltrantes de tumores (TILs), terapia génica del receptor de células T (TCR) y terapia con linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico (CAR). (Izquierda) ACT con TILs, se reseca quirúrgicamente parte del tumor y posteriormente se aíslan los TILs y se expanden *ex vivo*. El paciente recibe un régimen de acondicionamiento linfodeplecionador. (Derecha) ACT con células T periféricas modificadas genéticamente: terapia génica TCR y terapia génica CAR. Para ambas las células T periféricas se aíslan mediante leucaféresis. Estas son luego transfectadas con vectores virales para expresar un TCR o CAR específico, respectivamente. [75]

5.3.1. El receptor CAR

Las células T CAR combinan la especificidad de un anticuerpo monoclonal con la capacidad citolítica de una célula T y son capaces de llevar a cabo esta acción gracias a su receptor. Un CAR es un receptor híbrido que combina 2 dominios: un dominio extracelular, de unión al antígeno tumoral, unido por un dominio transmembrana a un dominio intracelular de señalización celular, capaz de activar al linfocito T. [75,82]

El dominio extracelular confiere especificidad a las células CAR y está constituido por un scFv de un anticuerpo monoclonal, el scFv es el fragmento Fab de anticuerpo monoclonal. Consta por lo tanto de una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L), ambas unidas por un pequeño segmento de polipéptido. A través del scFv, las células CAR-T pueden reconocer y unirse directamente a antígenos específicos de tumor, sin necesidad de que éstos estén presentados por moléculas MHC. Por su parte el dominio intracelular de transducción de señal está compuesto principalmente por la cadena $CD3\zeta$ del TCR, que es el iniciador de la señalización en los linfocitos T. [82,85]

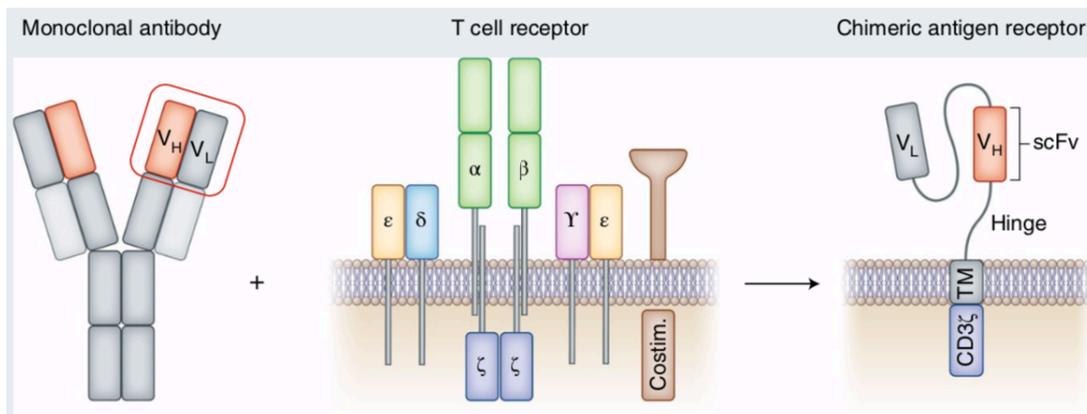


Figura 8. Estructura del receptor antigénico de las células T CAR. Las células T CAR se diseñan fusionando el scFv de un anticuerpo monoclonal a un dominio transmembrana y a un dominio $CD3\zeta$ de señalización intracelular capaz de provocar respuesta en las células T. **V_H** (cadena pesada); **V_L** (cadena ligera); **costim** (co-estimulación); **TM** (transmembrana). [85]

En el caso de las CAR T cells, el antígeno objetivo es una molécula de superficie. El componente central de las CAR T cells como ya se ha explicado, es su receptor quimérico, éste no va a depender de que el antígeno a reconocer sea presentado previamente por las moléculas MHC I, como se demostró a finales de la década de 1980 en los primeros estudios que evaluaban CARs de primera generación. Por lo tanto, las CAR T cells son MHC independientes, este fenómeno permite que se reconozcan un mayor número de antígenos de superficie diferentes. Así mismo, evitan las restricciones que se producen cuando la expresión de MHC I está regulada negativamente por el tumor impidiendo que se expongan los antígenos tumorales endógenos. El

inconveniente es que moléculas intracelulares no se van a poder reconocer, ya que estas necesitan ser procesadas y posteriormente presentadas por las MHC I. [75, 82]

Tras el reconocimiento del antígeno, se produce la cascada de señalización celular que lleva a la activación del linfocito. El iniciador de la señalización es principalmente la cadena CD3 ζ . Los ensayos iniciales en humanos con CAR-T cells se realizaron con CAR-T cells llamadas de primera generación ya que contenían solo el dominio CD3- ζ . La activación de las CAR-T cells de primera generación se consigue a través del motivo ITAM de la cadena CD3- ζ , cuya fosforilación en tirosinas inicia la activación del linfocito, regulación de secreción de IL-2 y lisis de células tumorales. No obstante, ensayos realizados con estas CAR-T cells de primera generación revelaron activación y expansión limitadas lo que eventualmente conducía a la apoptosis de las CAR-T cells. [75,82,85]

Además de los dominios de señalización intracelular, es conocido el papel de las moléculas co-estimuladoras CD28 y CD137 (4-1BB), las cuales mejoran la proliferación celular y el tiempo de supervivencia in vivo, así como la actividad antitumoral de los linfocitos T. Por lo tanto, la respuesta efectiva de las CAR-T cells se vería beneficiada por una segunda señal coestimuladora, llevada a cabo por moléculas como CD28 o 4-1BB. Sobre esta base, el diseño de CAR-T cells de segunda generación incluía dominios coestimuladores como CD28 y 4-1BB. Esta señal coestimuladora amplía la primera señal producida por el complejo TCR/CD3- ζ , aumentando la proliferación de CAR-T cells, la secreción de citocinas y la expresión de proteínas antiapoptóticas. [75,82]

En este contexto se están desarrollando las CAR de tercera generación que tienen como objetivo abarcar la capacidad de señalización de dos dominios coestimuladores, principalmente CD28 en combinación con 4-1BB u OX-40. [75]

5.3.2. Las CAR T cells en clínica: *target* CD19

Se ha comprobado que la inmunoterapia con CAR-T cells es un gran avance en el tratamiento de tumores hematológicos. De hecho, la inmunoterapia con CAR-T cells fue titulada como el avance del año por parte de la ASCO (American Society of Clinical Oncology) y fue publicado en el Journal of Clinical Oncology de 2018. [86] Este reconocimiento vino tras la aprobación de la FDA en 2017 de dos terapias con CAR-T cells para el tratamiento de tumores hematológicos de células B en pacientes tanto adultos como pediátricos lo que es un hito en las inmunoterapias contra el cáncer. En 2018, estas terapias fueron aprobadas en la Unión Europea, Reino Unido y Canadá. [73,82]

Los mejores resultados clínicos con CAR-T cells se han obtenido principalmente en el tratamiento de leucemia y linfoma CD19⁺. La glicoproteína extracelular CD19 es el *target* mas comúnmente utilizado en la terapia con CAR T cells. Demostró ser una diana óptima ya que se expresa en una fase temprana durante el desarrollo de células B y su expresión se mantiene hasta la diferenciación a células plasmáticas. Por lo tanto, los tumores malignos de células B que se originan a partir de todos estos estados de

diferenciación también van a expresar CD19. No obstante, CD19 se expresa en la superficie de la mayoría de las células B, tanto sanas como tumorales, y por ello el tratamiento con CD19-CAR-T cells tendrá como efecto secundario la aplasia transitoria o duradera de células B e hipogammaglobulinemia, pudiendo aumentar el riesgo de infecciones. Este efecto se ha manejado con reemplazo de inmunoglobulinas por vía intravenosa. [75]

En 2003, un grupo del Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering de Nueva York, fue el primero en conseguir la transfusión exitosa de linfocitos genéticamente modificados con CD19-CAR en ratones inmunodeficientes con diversas neoplasias malignas de células B. Los resultados mostraban reducción e incluso erradicación a largo plazo de los tumores. [87] No obstante como ya se introducía al comienzo del apartado, no fue hasta 2017 cuando se aprobaron los primeros tratamientos con CAR-T cells en humanos. [75]

En la actualidad hay dos terapias CD19-CAR aprobadas por la FDA para la leucemia linfocítica aguda y para diferentes tipos de linfoma agresivo de células B no hodkin. Axicabtagene ciloleucel (Yescarta) con CD28 como molécula coestimuladora y tisagenlecleucel (Kymriah) con 4-1BB como molécula coestimuladora.

En agosto de 2017, la FDA aprobó tisagenlecleucel (Kymriah) para el tratamiento de la LLA de células B refractaria o en recaída en pacientes de menores de 25 años. Esto supuso uno de los mayores avances en el tratamiento del cáncer infantil. La aprobación se basó en un ensayo clínico realizado en niños y adultos jóvenes con LLA recidivante o refractaria, en 52 (82%) de 63 pacientes el cáncer entró en remisión en los 3 meses posteriores tras recibir tisagenlecleucel, y el 75% de los pacientes permanecían en remisión a los 6 meses. [88]

Sobre la base de estos resultados, se inició otro estudio de fase 2, multicéntrico de tisagenlecleucel. En este estudio, se utilizó una cadena de suministro global de CAR-T cells y se incluían 11 países (de América del Norte, Europa, Asia y Australia). El análisis de resultados mostró una tasa de remisión global del 81% tras más de 3 meses de seguimiento. Las remisiones fueron duraderas, con una tasa de supervivencia libre de recaídas del 80% a los 6 meses. [89]

Unos meses más adelante, en octubre de 2017, otro ensayo utilizó la terapia con CAR-T cells, esta vez para tratar el linfomas refractarios de células B grandes. La terapia con células CAR-T utilizada en este estudio fue axicabtagene ciloleucel (Yescarta). En este ensayo multicéntrico de fase 2, se reclutaron 111 pacientes con distintos tipos de linfomas de células B que incluían: el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL diffuse large B-cell lymphoma), linfoma mediastínico primario de células B grandes y linfoma folicular ya transformado a difuso. Todos los pacientes tenían enfermedad refractaria a pesar de haberse sometido a terapia previa. La tasa de respuesta objetiva fue de 82%, y la tasa de respuesta completa fue de 54%. Con una media de seguimiento de 15,4 meses, el 42% de los pacientes seguían presentando respuesta, y el 40% presentaba

respuesta completa. La tasa global de supervivencia a los 18 meses fue del 52%. [90] Estos hallazgos destacan positivamente si se comparan con los resultados del estudio SCHOLAR-1 realizado para evaluar la eficacia de las terapias existentes para los linfomas de células B, que muestra una tasa de respuesta objetiva del 26% y una tasa de respuesta completa del 7%. [91]

La última aprobación de la FDA se la llevo tisagenlecleucel, que en este caso fue aprobado para su segunda indicación, en este caso la misma que había recibido Axicabtagene ciloleucel, tratamiento de pacientes adultos con DLBCL, linfoma mediastínico primario de células B grandes y DLBCL derivado de linfoma folicular, recidivante o refractario después de dos o más líneas de terapia sistémica. El estudio JULIET, de fase 2, en el que se basó la aprobación, evaluaba como objetivo primario la obtención de la mejor tasa de respuesta general. La mejor tasa de respuesta global fue del 52%: siendo 40% respuestas completas y 12% respuestas parciales. A los 12 meses después de la respuesta inicial, la tasa de supervivencia libre de recaída se estimó de 65% (79% entre los pacientes con una respuesta completa). [92]

En el otro extremo del espectro de respuesta entre las neoplasias malignas de células B se encuentra la leucemia linfocítica crónica (CLL), que también demuestra una expresión alta y homogénea de CD19, pero se ha encontrado que las CAR-T cells en esta neoplasia solo consiguen respuestas completas en el 15-30% de los pacientes. Recientes estudios que comparaban las respuestas en LLA versus CLL han demostrado que, a pesar de que los procesos de fabricación para expresar el mismo receptor CD19.4-1BB-CAR son idénticos, el 100% de los pacientes con LLA cuyas CAR-T cells experimentaban expansión alta, tuvieron también respuestas completas, mientras que una fracción considerable de pacientes con CLL cuyas CAR-T experimentaban una expansión similarmente alta, no conseguían esas tasas de respuesta completa, lo que implica que para conseguir respuestas completas en la CLL, son necesarios requisitos adicionales. En general, la disfunción basal de las células T parece ser una causa importante de resistencia primaria a la terapia CAR en la CLL. [85]

5.3.3. Otros targets

En la actualidad, hay muchos objetivos involucrados en proyectos clínicos de CAR-T cells. Se ha diseñado una nueva terapia con CAR-T cells dirigida a la molécula de superficie CD22. Un ensayo de fase I utilizando estas CD22-CAR-T incluyó 21 pacientes de entre 7 y 30 años con LLA que habían recaído o no habían respondido a tratamientos anteriores. Quince de estos pacientes habían recibido terapia con CD19-CAR-T, pero no habían obtenido respuestas. Los resultados mostraron que un total de 73% de los pacientes alcanzaron la remisión completa. [93]

Es importante destacar que las células CAR-T también se están evaluando en otras neoplasias hematológicas. Para la leucemia mieloide aguda (AML), varios objetivos están bajo investigación, como CD33 y CD123, sin embargo, la expresión de estos antígenos en células no tumorales sugiere potenciales toxicidades. Datos clínicos han

mostrado cierta eficacia de la terapia CD30-CAR-T en el linfoma de Hodgkin. En el mieloma múltiple, las terapias con CAR-T cells que utilizan como *target* el antígeno de maduración de células B (BCMA) están mostrando excelentes respuestas clínicas en múltiples ensayos. De hecho, los primeros ensayos clínicos presentados en la reunión anual de la ASCO de 2017 incluyeron a 35 pacientes con mieloma múltiple que habían recaído después del tratamiento. De estos 35 pacientes, el 74% experimentó una respuesta completa de mieloma múltiple después de recibir células BCMA-CAR. Otro ensayo que incluyó a 16 pacientes mostró a su vez una tasa de respuesta global del 81%. La mediana de supervivencia libre de recaída fue de 31 semanas. [94] Una amplia variedad de distintas CAR-T cells dirigidas a BCMA están en desarrollo clínico activo. Se espera que las BCMA-CAR-T cells sean aprobadas pronto para la terapia clínica de mieloma múltiple. [73,82]

5.3.4. Problemas y desafíos en la utilización de las CAR-T cells

El éxito demostrado por las células CAR-T en los tumores hematológicos respalda la aplicación de esta tecnología al entorno de los tumores sólidos que son responsables de más de las tres cuartas partes de las muertes relacionadas con el cáncer y, por lo tanto, representan una gran necesidad médica. Se están llevando a cabo un número creciente de ensayos clínicos que utilizan la terapia con CAR-T cells en tumores sólidos. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos son insatisfactorios. Esto es así principalmente debido a la presencia de complejas barreras adicionales que presentan los tumores sólidos en comparación a las neoplasias hematológicas. [73,82]

Algunas de esas barreras son: las características histopatológicas de los tumores sólidos, el "tráfico" inadecuado de las CAR-T cells a los lugares donde se encuentran los tumores sólidos en el cuerpo, así como el microambiente tumoral inmunosupresor, la heterogeneidad tumoral y la escasez de antígenos específicos. De hecho, una de las principales preocupaciones que enfrentan las terapias con CAR-T cells en tumores sólidos es el riesgo de toxicidad cruzada llamada "*on-target off-tumor toxicity*", ya que los antígenos de superficie celular específicos de tumores sólidos son también expresados en muchos tejidos sanos, y los CAR dirigidos a estos antígenos podrían producir daño masivo de estos órganos. [95]

Las células tumorales hematológicas se encuentran dispersas, en cambio, los tumores sólidos generalmente forman masas compactas en los distintos órganos desde el principio del proceso tumoral, lo que significa un obstáculo para el reclutamiento de células anti-tumorales en el área afectada. Aún así, los ensayos clínicos realizados con CAR-T cells dirigidas a tumores sólidos sugieren que las CAR-T cells pueden llegar a los sitios del tumor y atacar al antígeno, pero fallan en expansión, persistencia y producción de respuesta objetiva. Al llegar al tumor, las células T encuentran un denso microambiente tumoral inmunosupresor que incluye células inmunosupresoras como T-regs, TAMs (tumor-associated macrophages) y células mieloides supresoras. De la misma forma, este microambiente se caracteriza por presentar hipoxia, necrosis, escasez de nutrientes y una serie de moléculas inmunosupresoras que ya conocemos

como PD-L1, IL-10 y TGF- β . Todos estos factores comentados conducen a una rápida pérdida de actividad funcional y eficacia terapéutica de las CAR-T cells. [73,95]

Como algo resaltable en la terapia de tumores sólidos, tenemos la emergencia de tratamientos eficaces en tumores cerebrales. EGFRvIII, una versión mutada del receptor del factor de crecimiento epidérmico, parece ser un *target* CAR convincente ya que está ausente en los tejidos sanos. Las EGFRvIII-CAR-T cells se han administrado por vía intravenosa a pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) recidivante, y fueron consideradas como seguras y una terapia factible en estos pacientes. Por otro lado, el estudio reveló que las respuestas pueden estar limitadas por la pérdida de expresión del antígeno y su expresión heterogénea dentro del tumor. [96]

No obstante, los ensayos realizados en tumores sólidos han permitido identificar algunos fallos en la terapia con CAR-T cells, lo que ha facilitado el desarrollo de vías para sortear estas adversidades. Además, estas potenciales mejoras pueden beneficiar de la misma forma a las neoplasias hematológicas, optimizando el tratamiento y mejorando el éxito a largo plazo y la seguridad de los tratamientos con CAR-T cells.

Los principales problemas presentados por las CAR-T cells son: a) eficacia antitumoral limitada por la falta de expansión significativa y/o supervivencia de las CAR-T cells en el tumor, destacando como factor importante en este proceso la disfunción de las propias CAR-T cells; (b) disminución o pérdida significativa de la expresión del antígeno tras la administración de CAR-T cells, lo que sugiere cierto nivel de inmuoediting. La presencia de heterogeneidad de antígeno en las diferentes células de un mismo tumor y la pérdida de la expresión del antígeno apuntan como problemas principales en este aspecto; (c) toxicidad severa fuera del tumor, incluso cuando los antígenos se expresan a niveles muy bajos en los tejidos sanos. [73, 85]

Las estrategias que se desarrollan para sortear estos desafíos principalmente son:

A) Potencia y persistencia

La eficacia de las células CAR-T se sustenta en una alta capacidad de proliferación y de persistencia en los pacientes. Los esfuerzos dirigidos a mejorar la persistencia de las células CAR-T se han centrado en optimizar su diseño, planificando dominios intracelulares que consigan una mayor persistencia de estas células. Los productos actuales aprobados por la FDA contienen CD28 o 4-1BB como dominio coestimulador. Estudios indican que las CAR con CD28 como coestimulador tienen una mayor actividad antitumoral inicial, mientras que la señalización a través de 4-1BB mejora la persistencia de las CAR-T cells y mitiga el agotamiento. Se ha observado que las CAR-T cells con coestimulador 4-1BB muestran persistencia en la sangre de los pacientes durante una mediana de 168 días, en contraste, la mediana de duración de la persistencia de CD19-CAR-T cells basadas en coestimulación CD28 fue de aproximadamente 30 días, y rara vez se detectan después de 3 meses. [89] Los mecanismos responsables de estos hallazgos siguen sin entenderse, pero parece ser que

una mayor potencia de la señalización aguas abajo de la coestimulación CD28 frente a 4-1BB, al igual que cambios mitocondriales que ocurren en las células 4-1BB.CAR-T pueden estar involucrados. Además, las 4-1BB.CAR-T tienen niveles más altos de proteínas antiapoptóticas (BCL-2 y BCL-XL) lo que favorece aún más su perfil metabólico al mejorar la generación de memoria celular. Por todo lo comentado, es posible que las CD28.CAR-T cells sean mejores para la inducción de remisión o como "puente para el trasplante", mientras que las 4-1BB.CAR-T pueden ser más útiles como terapia definitiva. [73, 85, 97, 98]

Otros dominios de señalización, que incluyen CD27, OX40 y dominios ICOS, también se están investigando en ensayos preclínicos. La señalización a través de ICOS, un miembro de la familia CD28, ha mostrado tener un papel clave en la mejora de la persistencia de las células T. Por lo tanto, las CAR-T cells de tercera generación que combinan dos dominios coestimuladores, generalmente uno de la familia CD28 (CD28 o ICOS) y uno de la familia TNFR (4-1BB u OX40), ha mostrado activar diferentes señales, combinando potencia con persistencia a largo plazo, y son candidatas prometedoras para la futura evaluación en clínica. [99]

Otros estudios preclínicos se han centrado en integrar la señalización de citocinas (como la señalización de IL-7) en las células T CAR, lo que ha dado como resultado una potencia y persistencia mejoradas de las CAR en modelos preclínicos. Esta integración de expresión de citocinas se lleva a cabo a través de las CAR-T cells de cuarta generación también llamadas TRUKs (T cells redirected for universal cytokine-mediated killing) o CAR-T armados. Las TRUKs ofrecerían la oportunidad de aprovechar el efecto adyuvante de las citocinas como si se tratase de farmacias vivas, con las ventajas de poder dispensar el fármaco de forma local en el sitio del tumor y obtener la máxima actividad in situ con una toxicidad sistémica mínima. Se ha demostrado que la expresión de IL-12 en el microambiente tumoral mejora la actividad citolítica de las células T, mitiga la inmunosupresión mediada T-regs y recluta y activa la respuesta inmune innata. De la misma forma la expresión de otras citoquinas, como IL-15 o IL-18, se han propuesto como estrategia ya que tanto IL-15 como IL-18 aumentan los efectos antitumorales de las células T infundidas al prolongar la persistencia y expansión de las células T. [73, 82, 85, 97]

De la misma forma, estrategias para mejorar la persistencia de forma independientemente al diseño de células T CAR están siendo probadas; por ejemplo, administración de células artificiales presentadoras de antígeno (AAPC) diseñadas para activar las CAR-T cells ha demostrado aumentar la expansión y la durabilidad de estas. Las AAPC cuentan con ventajas para optimizar y controlar con precisión la señalización requerida para la activación y expansión de las CAR-T cells. Estas ventajas incluyen señales que regulan la adhesión celular, la coestimulación, la secreción de citocinas y las interacciones entre el TCR los complejos MHC-Ag. [98]

El desplazamiento de las CAR-T cells hacia un fenotipo menos diferenciado de memoria, similar a las células madre, es otro método para mejorar las respuestas terapéuticas y la persistencia celular. Un estudio realizado en la Universidad de Pensilvania que evaluó los biomarcadores predictivos de la respuesta clínica al tratamiento con CD19-CAR-T cells en pacientes con CLL, encontró que los pacientes que respondían habían sido tratados con fórmulas de preinfusión que contaban con células T menos diferenciadas. En línea con esto, los estudios preclínicos en modelos animales han demostrado que la transferencia adoptiva de subconjuntos de células T menos diferenciadas, incluidas las células T naive y células madre memoria, da como resultado una mayor expansión in vivo, persistencia y respuesta antitumoral superior en comparación con los subconjuntos de células T más diferenciadas. Esto probablemente se fundamente en que las células T menos diferenciadas persisten más tiempo y son una fuente continua de células citotóxicas efectoras. Por lo tanto, los procedimientos que inducen la transformación de las células CAR T cells en células T de memoria central y células T de memoria similar a las células madre podrían ser una alternativa para conseguir respuesta duradera y persistencia de las CAR-T cells. [73,98]

Por otro lado, a pesar de poder conseguir un diseño de producto de CAR-T cells óptimo, la disfunción de las células T una vez producida la respuesta clínica inicial ha mostrado ser uno de los principales problemas causantes de las recaídas de los pacientes. La disfunción de los linfocitos T puede estar favorecida por factores intrínsecos, conocidos como agotamiento de las células T, así como por la inmunosupresión extrínseca mediada por el TME.

Como ya se ha revisado en este trabajo, el agotamiento de los linfocitos T, incluida la senescencia, surge en el transcurso de las infecciones crónicas y en el cáncer, y se debe en parte a la persistencia crónica del antígeno. Las células T disfuncionales se caracterizan por proliferación alterada y por expresión en diferentes grados de varios receptores inhibitorios, incluidos PD-1, TIM-3, LAG-3 entre otros. Por otro lado, las células tumorales pueden aumentar la expresión de ligandos coinhibitorios, como PD-L1, tras la liberación de citocinas Th1 mediada por activación de células T. Por consecuencia, una posible estrategia para superar la disfunción de las CAR-T cells es protegerlas de las señales inhibitorias. [73, 85, 98]

Las estrategias que combinan las CAR-T cells con la terapia con ICIs, están emergiendo como una probable solución a este problema. La mayoría de ellas centradas en la interacción PD-1/PD-L1. Estudios que evalúan el papel de estos ICIs ya están ofreciendo resultados positivos. [100,101] De la misma forma, también se están desarrollando una gran cantidad de estrategias para diseñar CAR-T cells que sean resistentes a los factores supresores dentro del TME. Una de estas estrategias cuenta con la co-expresión de receptores predominantemente negativos de TGF- β con un CAR dentro de los linfocitos T. Así mismo la combinación de las terapias CAR con la utilización de anticuerpos monoclonales que supriman estas citocinas y células inmunosupresoras puede revertir el microambiente inmunosupresor en cierta medida. [73, 85, 98]

B) Heterogeneidad y pérdida de antígeno.

La heterogeneidad es un sello distintivo del cáncer, y las terapias dirigidas a una sola molécula raramente consiguen erradicar completamente el tumor. Por lo tanto, como era de esperar, la pérdida de CD19 se ha convertido en la principal causa de recaída después del tratamiento con CD19-CAR-T cells. Tanto en pacientes con LLA como en pacientes con glioblastoma tratados con CAR-T cells, la pérdida de expresión del antígeno se ha observado como un mecanismo de escape tumoral frecuente. [73,85]

En el ensayo de tisagenlecleucel para el tratamiento de la LLA [89], el 94% de las recaídas analizadas se atribuyeron a la aparición de células B malignas que carecían de CD19. No está claro si estas células estaban presentes desde el inicio, si se ha producido un crecimiento de las mismas durante el proceso de tratamiento debido a la presión de la terapia anti-CD19 CAR-T, o si desarrollan mutaciones de novo para escapar de esta presión selectiva. Mecanismos establecidos que conducen a la pérdida de la expresión de CD19 incluyen: I) *splicing* alternativo, que genera isoformas CD19 que no pueden ser reconocidas y/o expresión reducida de éstas en la superficie celular; II) interrupción en el transporte de CD19 a la superficie celular. Nuevos estudios sugieren que la pérdida de la expresión del antígeno podría contribuir al fracaso del tratamiento no solo en tratamientos con *target* CD19 sino también en tratamientos con CD22-CAR-T. Además, se ha observado que la pérdida completa de la expresión del antígeno podría no ser necesaria para el desarrollo de resistencia, ya que una simple disminución de la expresión de antígeno puede ser suficiente. [93] [73,85, 98]

La tendencia actual es atacar más de un antígeno en las células leucémicas para tratar de reducir el escape tumoral. Los posibles *targets* expresados en los blastos de la LAA son CD22, CD20 y CD123. En consecuencia, varios grupos han desarrollado distintos tipos de células CAR-T para que sean bi-específicas e incluso tri-específicas: a) tándem-CAR, estas CAR-T se consiguen utilizando un receptor que incorpora dos scFv unidos en una sola molécula (tándem-CAR); b) dual-CAR-T, en las que dos CAR monoespecíficos se expresan en el mismo linfocito; c) Pool-CAR, utilizando una mezcla de vectores diferentes durante el proceso de transducción, para conseguir la expresión de receptores CAR, resulta en un producto mixto de células CAR. [73,85]

Las CD19/CD22-CAR-T y CD19/CD20-CAR-T biespecíficas han entrado recientemente en ensayos clínicos, y hay trabajos preliminares que presagian actividad clínica asociados con un perfil de seguridad favorable. [102,103]

Más recientemente, se han desarrollado los CAR intercambiables, UniCAR. Son CAR muy versátiles que podrían atacar múltiples antígenos asociados a tumores sin necesidad de reedición y nueva producción de células T. Se han desarrollado mediante diseño de un CAR que contiene una serie de dominios scFv solubles, modulares y etiquetados, asociados a un interruptor que actúa como un puente de unión entre la célula objetivo y el CAR, permitiendo que los objetivos se cambien sin volver a diseñar

las células T. De esta forma se evita el costoso proceso de fabricación de las CAR-T cells y al mismo tiempo, se amplía la selección de antígenos tumorales como *targets*. [73, 97]

C) Toxicidad.

Hasta ahora, la mayoría de los esfuerzos en la ingeniería de CAR-T cells se han centrado en redirigir su orientación a antígenos tumorales específicos y mejorar la potencia de su respuesta y proliferación. Sin embargo, en casi todos los ensayos clínicos, ha habido efectos adversos graves, algunos tolerables y otros letales, indicativos del increíble poder de los linfocitos T activados. Además, a medida que se diseñan CAR-T cells con mejores perfiles de proliferación y actividad, se aumentará el potencial de efectos secundarios adversos.

En el contexto de la terapia con células CD19-CAR-T, el llamado síndrome de liberación de citoquinas (CRS cytokine-release syndrome, por sus siglas en inglés) se observa en la mayoría de los pacientes con LLA y linfoma no Hodkin. [89-92] Este síndrome se caracteriza por la producción excesiva de moléculas inflamatorias provocado por las CAR-T cells. Los pacientes que experimentan este CRS presentan altos niveles de citocinas (IL-6, TNF- α) y otros marcadores inflamatorios (ferritina, proteína C reactiva), junto a síntomas físicos como fiebre, hipotensión, mialgias y otros síntomas sistémicos. El uso inmediato de Tocilizumab (AcM anti-IL-6) en el CRS puede controlar el cuadro clínico en la mayoría de los pacientes. De hecho, el Tocilizumab está aprobado por la FDA para el tratamiento del CRS grave o potencialmente mortal inducido por CAR-T cells en pacientes de mayores de 2 años. Vale la pena señalar que en el proceso fisiopatológico del CRS, no solo las CAR-T cells participan en la síntesis y liberación masiva de citocinas, sino también los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. [73, 82, 98]

En algunos pacientes tratados con CD19-CAR-T cells, el CRS se sigue a los pocos días de neurotoxicidad, que actualmente tiene una etiología desconocida. La incidencia de esta complicación es del 40%, [104] y cabe señalar que puede aparecer de forma aislada sin acompañarse de CRS. Los síntomas incluyen disminución de la conciencia, confusión, convulsiones e incluso edema cerebral. El Tocilizumab no mejora ni evita la neurotoxicidad. [82]

Aunque el tratamiento del CRS se basa en la administración de Tocilizumab, varias estrategias de diseño de nuevas CAR-T cells, con los últimos avances en ingeniería genética, se están valorando. Datos recientes de estudios preclínicos y clínicos indican que la disminución de la intensidad de señalización en las CAR-T cells podría tener como resultado una disminución de la toxicidad. Estas estrategias tienen como objetivo la limitación selectiva de la actividad de las células CAR-T mediante sistemas de control, basados en la introducción de genes que funcionen como interruptores y/o pro-apoptóticos. Los interruptores suicidas incluyen proteínas, como la caspasa-9 inducible, que desencadena la apoptosis. Dentro de los interruptores de eliminación tenemos

antígenos de superficie, como CD20 o epítomos extracelulares derivados de EGFR, que pueden mediar el agotamiento in vivo mediante la unión de anticuerpos monoclonales.

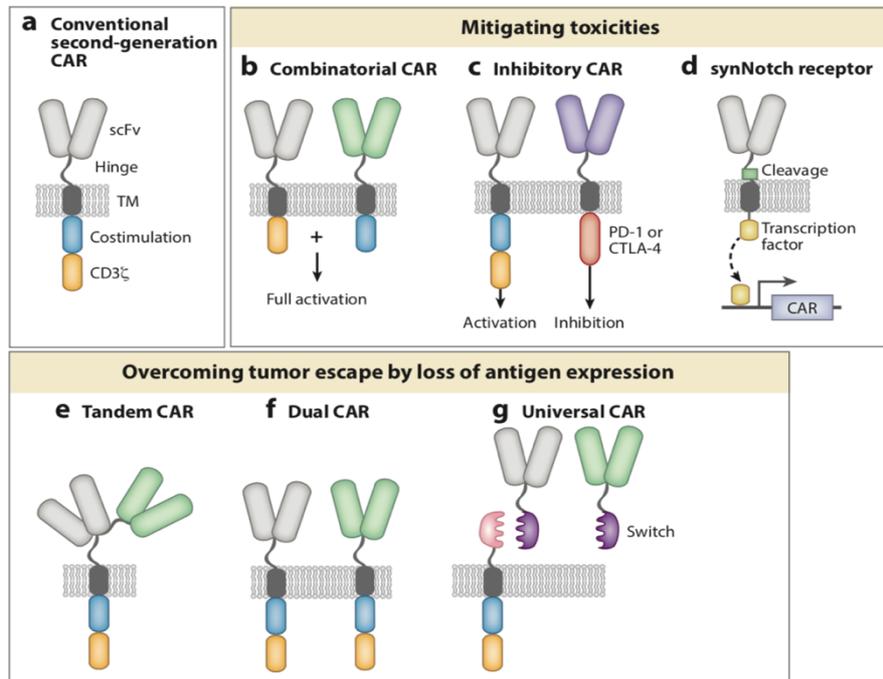


Figura 9. Células CAR-T de próxima generación. Nuevos CAR para mitigar la toxicidad y/o el escape tumoral. (a) CAR de 2ª generación: con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular acoplado a un dominio co-estimulador. (b) CAR combinatorios: dos receptores separados que se dirigen a dos Ags tumorales distintos. Uno lleva el dominio intracelular CD3ζ, y el otro el dominio coestimulador. La activación completa solo se logra si se reconocen ambos antígenos tumorales. (c) CAR inhibidores (iCAR): contienen el dominio intracelular de moléculas inhibitoras. El reconocimiento de Ags en las células normales por los iCAR desactiva las células T. (d) Receptores Notch sintéticos: implican un circuito de combinación de dos receptores. La activación del receptor Notch induce la expresión de un 2º receptor (CAR o TCR) que media la muerte celular. La activación eficiente de las células T solo ocurre cuando se reconocen ambos Ags. (e) Los tándem-CAR contienen 2 scFv distintos en una sola célula CAR. Estos receptores pueden ser activados por dos Ags afines diferentes. (f) Los CAR duales consisten en dos CAR de segunda generación separados que se dirigen a dos Ags tumorales diferentes. (g) Las CAR-T Universales incluyen células T diseñadas para expresar el CAR universal, un anticuerpo que reconocerá el Ag tumoral, y un interruptor que actúa como un puente entre la célula *target* y el CAR, permitiendo que los objetivos se cambien sin necesidad de reingeniería de las células T. [72]

Otra forma de controlar la activación de las CAR-T cells es la utilización de interruptores de encendido. En este caso se puede construir una CAR-T cell cuya activación sea inducible por otro fármaco. Este diseño consta de una CAR-T en el que el

scFV de reconocimiento y los dominios de señalización (CD3 ζ y motivos coestimuladores) están en polipéptidos separados, cada uno de los cuales contiene un dominio de heterodimerización inducible por el fármaco que queramos asociar. El CAR está inactivo hasta que se agrega el fármaco heterodimerizante, de esta forma se ensambla un receptor completamente funcional. La actividad de estas CAR-T con interruptor de encendido puede activarse o invertirse rápidamente, lo que permite, en principio, un alto nivel de control remoto por parte del médico. [97]

Otro aspecto importante de la toxicidad es la ya comentada *on-target off-tumor toxicity*. Las estrategias para evitar esta toxicidad fuera de tumor se basan en la utilización de CAR-T cells de segunda generación con configuración coestimuladora dividida o i-CAR (CAR inhibitorias). Estas células combinan construcciones de receptores CAR de activación convencionales, con receptores iCAR inhibitorios que contienen dominios inhibitorios derivados de CTLA-4 o PD-1. Cuando una CAR-T cell que expresa tanto el CAR normal como el iCAR se encuentre una célula tumoral que expresa solo el antígeno CAR, la CAR-T cell matará al objetivo. Pero cuando se encuentre los antígenos CAR e iCAR en la misma sinapsis inmunológica, la señalización reguladora negativa del iCAR anulará o amortiguará la señalización CAR, lo que disminuye la activación de las células T. Esto podría agregar mayor especificidad y precisión y garantizar que el efecto de las CAR-T cells alcanza la activación completa solo contra objetivos que expresan una matriz definida de antígenos asociados a tumores. [73, 97]

Como avance de última generación tenemos el desarrollo de un circuito de dos receptores en el que la activación de un receptor induce la expresión de un segundo receptor (un CAR o TCR) que media la muerte celular. Solo cuando ambos antígenos están presentes, el *priming* y la activación de las células T ocurren de manera eficaz. Esta estrategia se lleva a cabo gracias al receptor Notch sintético (synNotch). Estos synNotch, recientemente desarrollados, proporcionan una forma potencial de esculpir de manera flexible el receptor, induciendo respuestas de células inmunes personalizadas. Los receptores SynNotch contienen el dominio regulador central del receptor Notch nativo, pero cuentan con dominios de reconocimiento extracelular y transcripcionales intracelulares sintéticos. Cuando el receptor synNotch se une a su ligando en una célula tumoral, se induce una escisión intramembrana que libera un dominio transcripcional intracelular que ingresa en el núcleo y activa la expresión de genes diana para eventualmente producir la síntesis y la expresión del segundo receptor en la membrana del linfocito T. Los circuitos synNotch pueden usarse para generar programas de respuesta celular sintética en los que un único evento de reconocimiento de antígeno puede impulsar un programa de expresión génica personalizado. Las células T diseñadas con receptores synNotch tienen comportamientos personalizados altamente controlados. Pueden provocar que las células T produzcan perfiles de citocinas personalizadas a la carta, se sometan a programas de diferenciación definidos y generen cargas naturales y sintéticas de diferentes sustancias para los diferentes requerimientos de cada subtipo tumoral (como proteínas citotóxicas, anticuerpos, y otros activadores o supresores de la respuesta inmune), todo ello sin pasar por el requisito de activación canónica de células T. Una ventaja que nos ofrecen estas estrategias, por ejemplo, es

que la producción localizada de factores secretados podría evitar las toxicidades observadas con la producción sistémica o constitutiva de factores potentes como IL-12. Estas estrategias, aunque prometedoras, aún no se han probado en la clínica. [73,97, 105]

6. Conclusiones.

Como se ha revisado a lo largo de este trabajo, la inmunoterapia se ha convertido en un pilar fundamental en el tratamiento del cáncer, mejorando el pronóstico de muchos pacientes en una amplia variedad de neoplasias hematológicas y tumores sólidos.

Los dos principales impulsores de este éxito son los inhibidores del punto de control inmunológico (ICIs) y las terapias adoptivas con células T, concretamente las células modificadas genéticamente para expresar receptores quiméricos (CAR-T cells).

Los tumores malignos aprovechan las vías inhibitorias PD-1/PD-L1 y CTLA-4 para evadir el sistema inmunitario. La interrupción de este eje mediante el uso de fármacos como los ICIs puede inducir remisiones duraderas en diferentes tipos de cáncer. La aprobación por parte de la FDA de 6 ICIs en los últimos 7 años, ha marcado el panorama actual de la inmunoterapia y ha dado lugar a que nos encontremos ante una de las épocas más fructíferas en la historia del tratamiento del cáncer. El éxito de estos tratamientos ha conseguido restaltar el importante papel del sistema inmunitario en el control del cáncer.

Si bien es verdad que la inmunoterapia ha mostrado respuestas prometedoras en muchos pacientes, la resistencia adquirida se presenta como un verdadero desafío. Los posibles mecanismos de recaída incluyen: regulación negativa de la presentación del antígeno tumoral, por lo que las células T ya no reconocen las células tumorales, la pérdida de la función de las células T del huésped y el posible desarrollo de variantes de mutación de escape en las células tumorales objetivo.

También vale la pena señalar que la terapia con ICIs en la clínica hasta ahora se ha restringido a las terapias anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-PD-L1. En esta línea, en los últimos años ya se han identificado otras vías de puntos de control inmunitario y podrían representar objetivos adicionales ya sea en monoterapia o regímenes combinatorios.

Con estos objetivos adicionales en mente, a medida que aumenta el “almacén” de ICIs disponibles, el desafío en el futuro no consistirá en determinar qué poblaciones de pacientes se beneficiarán de la terapia con ICIs, sino en determinar qué fármaco (o combinación de fármacos) es el más adecuado para liberar la respuesta óptima por parte de las células T anti-tumorales en cada paciente en particular.

Es tentador pensar que el futuro de la terapia con ICIs para el tratamiento del cáncer será aún más prometedor que su presente, ya histórico.

Por otro lado, la terapia celular adoptiva con células T (ACT), representa un enfoque inmunoterapéutico personalizado que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años. Ya se han visto grandes éxitos con el uso del tratamiento con TILs en el melanoma y la terapia con CAR-T cells en las neoplasias hematológicas. La terapia CAR muestra el camino para que se produzca un cambio en el paradigma del tratamiento de tumores refractarios o recurrentes. Las CAR-T cells son fármacos "vivos" específicos para cada paciente. Sin embargo, el reto actual es garantizar una mayor optimización de esta prometedora modalidad de tratamiento para mejorar el efecto antitumoral y reducir la toxicidad asociada.

La experiencia clínica más reciente ha revelado los principales desafíos que deben encararse para hacer de las terapias con células inmunes modificadas genéticamente una forma fiable, segura y eficaz para tratar el cáncer, especialmente en el ámbito de los tumores sólidos. El tratamiento del cáncer es un problema multifactorial complejo, en el que se deben abordar simultáneamente varios problemas.

Afortunadamente, el auge de la inmunoterapia coincide con los avances en campos de la biología y la ingeniería genómica y, por lo tanto, ya se están desarrollando herramientas estratégicas para abordar estas necesidades. Es previsible que la producción automática de células T mediante ingeniería genética sea una tendencia importante en el futuro.

La comprensión del funcionamiento del sistema inmune es cada vez mayor y es muy probable que las bases de las terapias con células T modificadas se extiendan a otros tipos de células, como las células madre pluripotentes, las células madre hematopoyéticas y células NK. Las indicaciones también trascenderán el cáncer y se espera que incluyan enfermedades infecciosas, trasplantes de órganos y enfermedades autoinmunes.

7. Bibliografía

- [1] Adama JK, Odhavb B, Bhoolac KD. Immune responses in cancer. *Pharmacol Therapeut*, 99: 113-132, 2003.
- [2] Trombetta S, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23: 975-1028, 2005.
- [3] Sanchez-Paulete AR, Garasa S, Pérez-Gracia JL, et al. Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann Oncol*, 28 (Suppl 12): xi44-xi55, 2017.
- [4] Suarez-Almazor ME, Sang T. Kim, Abdel-Wahab N, Diab A. Immune-Related Adverse Events With Use of Checkpoint Inhibitors for Immunotherapy of Cancer. *Arthritis Rheumatol*, 69: 687-699, 2017.
- [5] Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity *Curr Opin Genet Dev*, 18: 11-18, 2008.
- [6] Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol*, 22: 23-32, 2012.
- [7] Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674, 2011.
- [8] Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E., et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*, 35 (suppl): S185-S198, 2015.
- [9] Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann. Oncol*, 23 (suppl 8): viii6-viii9, 2012.
- [10] Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*, 6: 715-727, 2006.
- [11] Max D. Wellenstein, Karin E. de Visser. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*, 48: 399-416, 2018.
- [12] Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJM, Costa MRSN, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 59:819-828, 2010.
- [13] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6:295-307, 2006

- [14] Lewis C, Murdoch C. Macrophage Responses to Hypoxia. *Am J Pathol*, 167: 627-635, 2005.
- [15] Gordon S. Innate Immune Functions of Macrophages in Different Tissue Environments. *J Innate Immun*, 4: 409-410, 2012.
- [16] Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Devel*, 32: 1267-1284, 2018.
- [17] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19: 1423-1437, 2013.
- [18] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357: 539-545, 2001.
- [19] Ribas A, Wolchok J. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359: 1350-1355, 2018.
- [20] Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*, 125: 3335-3337, 2015.
- [21] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348: 56-61, 2015.
- [22] Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am J Clin Oncol*, 39: 98-106, 2016.
- [23] Baumeister S, Freeman G, Dranoff G, Sharpe A. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol*, 34: 539-573, 2016.
- [24] Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*, 62: 29-39, 2018.
- [25] Park Y, Kuen D, Chung Y. Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance. *Exp Mol Med*, 50: 109, 2018.
- [26] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363: 711-723, 2010.
- [27] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*, 364: 2517-26, 2011.

- [28] Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 33: 1889–1894, 2015.
- [29] Fan Y, Zhang C, Jin S, Gao Z, Cao J, Wang A et al. Progress of immune checkpoint therapy in the clinic review. *Oncol Rep*, 41: 3-14, 2018.
- [30] Gibellini L, De Biasi S, Porta C, Lo Tartaro D, Depenni R, Pellacani G et al. Single-Cell Approaches to Profile the Response to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol*, 11: 490, 2020.
- [31] Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin Cancer Res*, 19: 5300-5309, 2013.
- [32] Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motifcarrying immunoreceptor. *Immunity*, 11: 141-151, 1999.
- [33] Sznol M, Powderly JD, Smith DC, Brahmer JR, Drake CG, McDermott DF, et al. Safety and antitumor activity of biweekly MDX-1106 (Anti-PD-1, BMS-936558/ONO-4538) in patients with advanced refractory malignancies. *J Clin Oncol*, 28 (suppl): 2506, 2010.
- [34] Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma, *N Engl J Med*, 373: 1803-1813, 2015.
- [35] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, J. Guigay, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for recurrent squamous- cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 375: 1856-1867, 2016.
- [36] El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*, 389: 2492-2502, 2017.
- [37] Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 18: 312-322, 2017.
- [38] Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357: 409-413, 2017.

- [39] Ready N, Farago AF, de Braud F, Atmaca A, Hellmann MD, Schneider JG, et al. Third-Line Nivolumab Monotherapy in Recurrent SCLC: CheckMate 032. *J Thorac Oncol*, 14: 237-244, 2019.
- [40] Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 379: 2040-2051, 2018.
- [41] Burtneß B, Harrington K, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 394: 1915-1928, 2019.
- [42] Chung HC, Piha-Paul SA, Lopez-Martin J, Schellens JHM, Kao S, Miller WH Jr, et al. Pembrolizumab After Two or More Lines of Previous Therapy in Patients With Recurrent or Metastatic SCLC: Results From the KEYNOTE-028 and KEYNOTE-158 Studies. *J Thorac Oncol*, 15: 618-27, 2020.
- [43] Chung HC, Ros W, Delord J-P, Perets R, Italiano A, Shapira-Frommer R, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results from the Phase II KEYNOTE-158 Study, *J Clin Oncol*, 37: 1470-1478, 2019.
- [44] Makker V, Rasco D, Vogelzang N, Brose M, Cohn A, Mier J, et al. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer: an interim analysis of a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 20:711-718, 2019.
- [45] Armand P, Rodig S, Melnichenko V, Thieblemont C, Bouabdallah K, Tumyan G, et al. Pembrolizumab in Relapsed or Refractory Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 37: 3291-9, 2019.
- [46] Nghiem P, Bhatia S, Lipson EJ, Sharfman WH, Kudchadkar RR, Brohl AS, et al. Durable Tumor Regression and Overall Survival in Patients with Advanced Merkel Cell Carcinoma Receiving Pembrolizumab as First-Line Therapy. *J Clin Oncol*, 37: 693-702, 2019.
- [47] Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattan S, Ogasawara S, Palmer D et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 19: 940-952, 2018.
- [48] Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 380: 1116-1127, 2019.

[49] Balar AV, Kulkarni GS, Uchio EM, Boormans J, Mourey L, Krieger LEM, et al. Keynote 057: Phase II trial of Pembrolizumab (pembro) for patients (pts) with high-risk (HR) nonmuscle invasive bladder cancer (NMIBC) unresponsive to bacillus calmette-guérin (BCG). *J Clin Oncol*, 37 (suppl): 350-350, 2019.

[50] Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 389: 67-76, 2017.

[51] Powles T, Durán I, van der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, De Giorgi U, et al: Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 391: 748-757, 2018.

[52] Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, 389: 255-265, 2017.

[53] West H, McCleod M, Hussein M, Morabito A, Rittmeyer A, Conter HJ et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20: 924-937, 2019.

[54] Schmid P, Rugo H, Adams S, Schneeweiss A, Barrios C, Iwata H et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 21: 44-59, 2020.

[55] Horn L, Mansfield AS, Szczyńska A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 379: 2220-2229, 2018.

[56] Hoffman-Censits J, Grivas P, Van der Heijden M, Dreicer R, Loriot Y, Retz M, et al. IMvigor 210, a phase II trial of atezolizumab (MPDL3280A) in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (mUC). *J Clin Oncol*, 34: 355-355, 2016.

[57] Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: A multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 17: 1374-1385, 2016.

- [58] Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 380: 1103-1115, 2019.
- [59] Powles T, O'Donnell P, Massard C, Arkenau H, Friedlander T, Hoimes C et al. Efficacy and Safety of Durvalumab in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *JAMA Oncol*, 3: e172411-e172411, 2017.
- [60] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. PACIFIC Investigators, Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 377: 1919-1929, 2017.
- [61] Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 394: 1929-1939, 2019.
- [63] Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 377: 1345-1356, 2017.
- [64] Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 378: 1277-1290, 2018.
- [65] Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H, Lenz H-J, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 18: 1182-1191, 2017.
- [66] Ready N, Hellmann MD, Awad MM, Otterson GA, Gutierrez M, Gainor JF, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *J Clin Oncol*, 37: 992-1000, 2019.
- [67] Long GV, Atkinson V, Cebon JS, Jameson MB, Fitzharris BM, McNeil CM et al. Standard-dose pembrolizumab in combination with reduced-dose ipilimumab for patients with advanced melanoma (KEYNOTE-029): an open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*, 18: 1202-1210, 2017.
- [68] Antonia SJ, Goldberg SB, Balmanoukian A, Chaft JE, Sanborn RE, Gupta A, et al. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multi- centre, phase 1b study. *Lancet Oncol*, 17: 299-308, 2016.

- [69] Kumar V, Chaudhary N, Garg M, Floudas CS, Soni P, Chandra AB. Current Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) Induced by Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front Pharmacol*, 8: 49-49, 2017.
- [70] Haanen JBAG, van Thienen H, Blank CU. Toxicity patterns with immunomodulating antibodies and their combinations. *Semin Oncol*, 42: 423-428, 2015.
- [71] Day D, Hansen AR. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint inhibitors. *BioDrugs* 30: 571-584, 2016.
- [72] Prestipino A, Zeiser R. Clinical implications of tumor-intrinsic mechanisms regulating PD-L1. *Sci Transl Med*, 11: eaav4810, 2019.
- [73] Guedan S, Ruella M, June CH. Emerging Cellular Therapies for Cancer. *Annu Rev Immunol*, 37: 145-171, 2019.
- [74] Spiess PJ, Yang JC, Rosenberg SA. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst*, 79: 1067-1075, 1987.
- [75] Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JBAG. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv*, 474:449-461, 2019.
- [76] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res*, 17: 4550-4557, 2011.
- [77] Andersen R, Westergaard MCW, Kjeldsen JW, Müller A, Pedersen NW, Hadrup SR, et al. T-cell responses in the microenvironment of primary renal cell carcinoma-implications for adoptive cell therapy. *Cancer Immunol Res*, 6: 222-235, 2018.
- [78] Lee HJ, Kim YA, Sim CK, Heo SH, Song IH, Park HS, Park SY, et al. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes and their potential for application as adoptive cell transfer therapy in human breast cancer. *Oncotarget*, 8: 113345–113359, 2017.
- [79] Stevanovic S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol*, 33 :1543–1550, 2015.
- [80] Rohaan MW, van den Berg JH, Kvistborg P, Haanen JBAG. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *J Immunother Cancer*, 6: 102, 2018.
- [81] Mullinax JE, Hall M, Prabhakaran S, Weber J, Khushalani N, Eroglu Z, et al. Combination of Ipilimumab and adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes for patients with metastatic melanoma. *Front Oncol*, 8: 44, 2018.

- [82] Zhao L, Cao YJ. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Front Immunol*, 10: 2250, 2019.
- [83] Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med*, 21: 914-921, 2015.
- [84] Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, et al. A Pilot Trial Using Lymphocytes Genetically Engineered with an NY-ESO-1-Reactive T-cell Receptor: Long-term Follow-up and Correlates with Response. *Clin Cancer Res.*, 21: 1019-1027, 2014.
- [85] Majzner R, Mackall C. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med*, 25: 1341-1355, 2019.
- [86] Heymach J, Krilov L, Alberg A, Baxter N, Chang SM, Corcoran RB, et al. Clinical Cancer Advances 2018: Annual Report on Progress Against Cancer from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*, 36: 1020-1044, 2018.
- [87] Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 9: 279-286, 2003.
- [88] Maude SL, Teachey DT, Rheingold SR, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, et al. Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *J Clin Oncol*, 34 (suppl): 3011-3011, 2016.
- [89] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378: 439-448, 2018.
- [90] Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 377: 2531-2544, 2017.
- [91] Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*, 130: 1800-1808, 2017.
- [92] Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 380: 45-56, 2019.
- [93] Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*, 24: 20-28, 2017.

- [94] Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*, 36: 2267-2280, 2018.
- [95] Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 19: 5-18, 2018.
- [96] O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrissette 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. *Sci Transl Med*, 9: eaaa0984, 2017.
- [97] Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*, 168: 724-740, 2017.
- [98] Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 16: 372-378, 2019.
- [99] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell*, 28: 415–28, 2015.
- [100] Li AM, Hucks GE, Dinofia AM, Seif AE, Teachey DT, Baniewicz D et al. Checkpoint inhibitors augment CD19-directed chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 132 (Suppl. 1): 556-556, 2018.
- [101] Chong EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Ambrose DE, Gonzalez V, Levine BL, et al. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR. *Blood*, 129: 1039-1041, 2017.
- [102] Schultz LM, et al. Phase 1 study of CD19/CD22 bispecific chimeric antigen receptor (CAR) therapy in children and young adults with B cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, 132: 898, 2018.
- [103] Shah NN, Zhu F, Schneider D, Taylor C, Krueger W, Worden A, et al. A phase 1 study with point-of-care manufacturing of dual targeted, tandem anti-CD19, anti-CD20 chimeric antigen receptor modified T (CAR-T) cells for relapsed, refractory, non-hodgkin lymphoma. *Blood*, 132: 4193, 2018.
- [104] Wang Z, Han W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy. *Biomarker Res*, 6:4, 2018.
- [105] Roybal K, Williams J, Morsut L, Rupp L, Kolinko I, Choe J et al. Engineering T Cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, 167: 419-432, 2016.