



UCH-FC
Biotecnología
L 864
C. 1

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



Comparación de la función efectora de linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos que señalizan vía OX40 y CD28

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Ernesto López Cabrera

Director del Seminario de Título:

Dr. Álvaro Lladser

Director Patrocinante:

Dr. Mario Roseblatt

24 de mayo del 2016

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Ernesto Ignacio López Cabrera**

“Comparación de la función efectora de linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos que señalizan vía OX40 y CD28”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Alvaro Lladser Caldera

Director Seminario de Título:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Mario Roseblatt Silber

Prof. Patrocinante del Seminario:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. María Rosa Bono Merino

Presidente Comisión:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal. A la derecha de la firma se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Dra. Fabiola Osorio Olivares

Evaluador:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago, julio de 2016

II. BIOGRAFÍA



Ernesto López Cabrera nació el 8 de Febrero del año 1991.

Estudió desde kinder a 2° año básico en el colegio Saint Gabriel, comuna de Providencia. Continuó sus estudios en el Instituto Alonso de Ercilla, comuna de Santiago, desde 2° básico a 4° medio, egresando el año 2009 y dando la Prueba de Selección Universitaria (PSU) ese mismo año.

Ingresó a la Universidad de Chile el año 2010 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias, egresando y obteniendo el grado de licenciado el año 2014.

Desde el año 2014 realizó su trabajo de Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunoterapia Génica a cargo del Dr. Álvaro Lladser. Mientras desarrollaba su tesis de pregrado, entró el año 2015 al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

IV. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, el cuál es aparentemente fruto de uno solo, tiene y tuvo el apoyo de incontables personas sin las cuales difícilmente estaría escribiendo estas palabras. Por ello, primero agradecer a mis padres por su apoyo y comprensión sin precedentes en mi decisión de ser un científico, camino que no ha sido sencillo para ninguno.

Agradecer a mis hermanos y a mis amigos. Sobre ellos he construido uno de los pilares fundamentales que me definen como persona y por extensión, como profesional. Gracias por su apoyo y compañía incondicional que independiente de lo oscuro de mi ánimo me permitió salir adelante con su ánimo y su cariño.

A todos los miembros del laboratorio de Inmunoterapia Génica que me han ayudado y guiado no solo en técnicas de laboratorio, también en lo que significa ser un buen científico y por sobre todo, persona. Entre ellos, al Dr. Álvaro Lladser por su guía y apoyo durante el desarrollo de todo este trabajo.

Finalmente, un agradecimiento especial y por separado a Karina Olivos, cuyo cariño supo sacarme delante de los momentos más difíciles, por enseñarme más de lo que pude aprender y por creer en mí todas las veces que titubeaba sobre mí mismo.

A ellos y a todos los que dejo obligadamente en el tintero por este escaso espacio, les dedico este pobre homenaje respecto a todo lo que merecen, muchas gracias a todos.

"¿Cuál es la diferencia entre un hombre y un esclavo? ¿Dinero? ¿Poder? No. El hombre elige. El esclavo obedece" - Andrew Ryan" – Bioshock

V. ÍNDICE DE CONTENIDOS

Biografía	ii
Agradecimientos	iii
Índice de figuras	vi
Lista de abreviaturas	vii
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Cáncer colorrectal	1
Sistema inmune y cáncer	2
Transferencia adoptiva de linfocitos T como terapia contra el cáncer	3
Linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos	5
Microambiente tumoral	9
Hipótesis	11
Objetivos	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
Materiales y Métodos	12
Estructura de los receptores de antígeno quiméricos	12
Medios utilizados	13
Transfección de línea celular empaquetadora y obtención de partículas retrovirales no replicativas	13
Cuantificación de partículas retrovirales no replicativas	14
Generación de líneas estables productoras de partículas retrovirales no	15

replicativas	
Purificación y activación de linfocitos T murinos	16
Obtención y activación de linfocitos T humanos	17
Transducción de linfocitos T con partículas retrovirales.	17
Estimulación de linfocitos T murinos transducidos.	18
Co-cultivo de células tumorales con linfocitos T CAR	19
Citometría de flujo	19
Ensayo de la capacidad antitumoral <i>in vivo</i> de linfocitos T CAR	20
Análisis estadístico	21
Resultados	22
Optimización de la generación de partículas retrovirales utilizando líneas productoras estables	22
Transducción de linfocitos T murinos y humanos	24
Activación específica contra CEA de linfocitos T CAR murinos	27
Activación de linfocitos T CAR murinos en presencia de ácido láctico.	30
Activación de linfocitos T CAR murinos con tumores que expresan CEA.	32
Discusión	35
Conclusiones	43
Bibliografía	44

VII. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los receptores de antígeno quiméricos utilizados	12
Figura 2. Optimización de la generación de partículas retrovirales utilizando líneas estables productoras	23
Figura 3. Transducción de linfocitos T murinos y humanos.	26
Figura 4. La activación mediada por CD28 u OX40 de linfocitos T CAR no presenta diferencias	29
Figura 5. La señalización vía OX40 protege a linfocitos T CAR contra la muerte celular inducida por ácido láctico	31
Figura 6. Reconocimiento y eliminación de tumores que expresan CEA por linfocitos T CAR	34

VIII. LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosin trifosfato

BSA: Albúmina Sérica Bovina.

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CAR: Receptor de antígeno quimérico

CD: Cluster de diferenciación.

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CTL: Linfocito T Citotóxico.

DC: Célula Dendrítica.

IFN- γ : Interferón gamma.

IgG1: Inmunoglobulina G1

IL: Interleuquina.

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.

LTR: Terminal de repetición largo

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I.

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II.

PBL: Linfocitos de Sangre Periférica.

PBMC: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PD-1: Muerte programada celular 1.

PD-L1: Ligando de Muerte Programada 1.

ScFv: Anticuerpo de cadena sencilla.

PI3K: Fosfoinositol 3 kinasa

SFB: Suero Fetal Bovino.

TCR: Receptor de Linfocitos T.

TGF- β : Factor de crecimientos transformante beta.

TILs: Linfocitos Infiltrantes de Tumor.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

TNRF: Familia de receptores de necrosis tumoral.

RESUMEN

La severidad de los efectos secundarios provocados por las terapias convencionales contra el cáncer sumado a la baja eficacia en pacientes en estado avanzado de la enfermedad ha promovido la búsqueda de nuevas terapias. La inmunoterapia ha emergido como una de las alternativas más promisorias en el desarrollo de terapias contra el cáncer. Entre ellas, la transferencia adoptiva de linfocitos T es una de las cuales ha obtenido mejores resultados. Los linfocitos T pueden ser modificados genéticamente con receptores de antígeno quiméricos (CAR, chimeric antigen receptor) los cuales están compuestos por: un dominio extracelular, basado en las regiones variables de anticuerpos monoclonales (scFv) específicos para el reconocimiento de los antígenos tumorales; un dominio intracelular compuesto por el dominio de señalización del TCR, generalmente CD3 ζ , y el dominio intracelular de receptores de coestimulación (como CD28 y OX40). Los linfocitos T que expresan el CAR en su superficie son capaces de reconocer específicamente estos antígenos tumorales y mediar la destrucción del tumor, estos han demostrado excelentes resultados en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres hematológicos. Sin embargo, los linfocitos T CAR no han mostrado la misma eficacia en pruebas clínicas contra tumores sólidos, en parte por una incompleta comprensión de como los dominios de señalización del CAR afectan la capacidad antitumoral de los linfocitos T CAR y cómo pueden hacer frente al microambiente inmunosupresor presente en el tumor. En este contexto, este Seminario de Título busca la generación de un protocolo eficiente de transducción de linfocitos T con CARs específicos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA) y comparar la estimulación mediada por CD28 (CAR-CD28) y por OX40 (CAR-OX40) así como en condiciones que simulen el microambiente tumoral. Para ello, se generaron líneas estables productoras de partículas retrovirales

codificantes de CAR-OX40 y CAR-CD28 y se logró transducir eficientemente linfocitos T murinos y humanos con ambos receptores quiméricos. Los linfocitos T CAR murinos se activaron potentemente ante la estimulación *in vitro* con la proteína CEA unida a placa, evaluado mediante la producción de IFN- γ , granzima B y la expresión de CD69 por citometría de flujo. Sin embargo, no se observaron diferencias entre la activación mediada por CAR-CD28 y CAR-OX40, tanto en linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺. Sin embargo, al llevar a cabo la activación de los linfocitos T CAR en presencia de 10 mM de ácido láctico, la viabilidad de linfocitos T CAR-CD28 disminuyó drásticamente, mientras que los linfocitos T CAR-OX40 resistieron la muerte celular, aunque la producción de IFN- γ se vio disminuida. Los linfocitos T CAR también se activaron específicamente al realizar cocultivos con células tumorales que expresan CEA, aunque no se observaron diferencias entre CAR-CD28 y CAR-OX40. Finalmente, los linfocitos T modificados con ambos CAR mostraron una eficacia similar para suprimir el crecimiento de tumores CT26-CEA *in vivo*. Este trabajo es el paso necesario tanto para el desarrollo de estudios de ciencia básica del funcionamiento de los CARs, como para la generación de terapias relevantes en nuestro país.

ABSTRACT

The severity of side effects caused by conventional cancer therapies together with the low efficacy in patients with advanced disease has prompted the search for new therapies. Immunotherapy has emerged as one of the most promising cancer therapies, in particular adoptive transfer of tumor-specific T cells have been shown to mediate strong antitumor effects. T cells can be genetically modified with chimeric antigen receptors (CAR), which comprise: an extracellular domain, based on the variable regions derived from specific monoclonal antibodies (scFv) to recognize tumor antigens; an intracellular domain consisting of the TCR signaling domain, usually CD3 ζ , and the intracellular domain of a costimulation receptor (as CD28 and OX40). T cells expressing a CAR on their surface are capable of recognizing specific tumor antigens and mediating tumor cell destruction. Clinical trials testing the efficacy of CAR T cells in hematologic malignancies have yielded promising results. However, CAR T cells have shown limited efficacy against most solid tumors in clinical trials, partly because our incomplete understanding of how CAR signaling domains affect antitumor activity of CAR T cells and how they can cope with the immunosuppressive tumor microenvironment.

In this context, this Seminar of Title aims to generate an efficient transduction protocol of T cells with a CAR specific against the carcinoembryonic antigen (CEA) and compare the effector activity induced by stimulation mediated by CD28 (CAR-CD28) or OX40 (CAR-OX40) *in vitro*, as well as under conditions simulating the tumor microenvironment. Therefore, stable cell lines producing CAR-encoding retroviral particles were generated for transducing T cells with chimeric antigen receptors. These retroviral particles were able to efficiently transduce mouse and human T cells with both

CAR-OX40 and CAR-CD28. When mouse T cells expressing either CAR-CD28 or CAR-OX40 were activated *in vitro* with plate-bound CEA protein, no differences between CAR-CD28 and CAR-OX40 were observed for CD8⁺ or CD4⁺ T cells, evaluated by the production of IFN- γ , as well as granzyme B and CD69 expression by flow cytometry. In contrast, CEA-specific activation of CAR T cells in the presence of 10 mM lactic acid drastically reduced the viability of T cells transduced with CAR-CD28. Interestingly, CAR-OX40 T cells were largely resistant to lactic acid-induced cell death although IFN- γ production was noticeably diminished. CAR T cells were also specifically activated when cocultures with CEA expressing tumor cells were performed, although no differences between CAR-CD28 and CAR-OX40 were observed. Finally, both CAR T cells showed similar efficacy to suppress tumor growth CT26-CEA *in vivo*. This work is a necessary step for both the development of basic studies on CAR T cell function and the generation of novel immunotherapies relevant in our country.

INTRODUCCIÓN

Cáncer colorrectal

Cáncer es un conjunto de enfermedades producidas por la proliferación descontrolada de las células de un tejido con capacidad de invasión a otros tejidos. Dentro de los cánceres con mayor incidencia en nuestro país se encuentra el cáncer colorrectal (Subsecretaría de Salud Pública, 2013), este consiste en un cáncer maligno que se origina en las paredes del intestino grueso o el recto. Existen diferentes clasificaciones de este tipo de cáncer dependiendo del estadio en el cual se encuentra, sus características genéticas y el historial del paciente. Según el estadio de la enfermedad, se considera en fase I si afecta las paredes del colon y el recto sin afectar la capa muscular, fase II si se encuentra invasión de todas las capas del colon o recto, fase III si se encuentra invasión localizada y metástasis en ganglios o fase IV si existe metástasis en órganos alejados, tales como hígado o pulmón. En la mayoría de los casos su desarrollo es asintomático o con síntomas inespecíficos tales como sangrado rectal, sangre en las deposiciones, pérdida inexplicable de peso, dolores frecuentes en la región abdominal, entre otros (Subsecretaría de Salud Pública, 2013). Debido a la falta de síntomas y signos específicos para esta enfermedad la detección de este cáncer se realiza en estadios avanzados cuando los tratamientos tradicionales no logran eliminar el foco neoplásico lo que se traduce en muy bajas expectativas de vida.

Los resultados obtenidos con el esquema habitual de tratamiento muestran que el porcentaje de supervivencia de 5 años post cirugía es del 80-90% para pacientes en estadio I , 70-75% en estadio II , 35-50% en estadio III y menos del 7% en estadio IV (Edge y Compton, 2010; Rao y col., 2011). Para los sistemas de salud en Chile y el mundo, la cobertura del tratamiento para esta enfermedad representa un desafío económico importante debido al elevado costo de las cirugías y de cuidados paliativos.

Sistema inmune y cáncer

La baja efectividad de los tratamientos para estados avanzados del cáncer, los altos costos de éstos, el alto número de muertes anuales debido a esta enfermedad y los severos efectos secundarios que se traducen en una pésima calidad de vida de los pacientes que sufren de cánceres hacen necesaria la búsqueda de nuevas terapias (Prieto y col., 2004). La inmunoterapia ha surgido como una alternativa promisorio de tratamiento debido a que aprovecha la capacidad del sistema inmune de reconocer y eliminar células tumorales de forma específica a través de la respuesta inmune adaptativa, principalmente mediante linfocitos T. Esta respuesta es iniciada por las células presentadoras de antígeno profesionales, fundamentalmente células dendríticas, las cuales tienen la capacidad de fagocitar antígenos tumorales (proteínas preferencialmente expresadas en las células tumorales y ausentes, o presentes en muy bajas cantidades en células normales), procesarlos y presentarlos a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC del inglés *major histocompatibility complex*) clase I y II para inducir la proliferación y activación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y CD4⁺ efectoros, respectivamente. En consecuencia, los linfocitos T se activan, induciendo su expansión clonal y la adquisición de un programa de diferenciación hacia un fenotipo efector que involucra la producción de citoquinas (como IFN- γ , TNF- α , IL-2, etc) y migración a los tejidos afectados, por ejemplo, tumores (Siddiqui I., y col., 2016). Los linfocitos T generados adquieren el potencial de reconocer, mediante su TCR (del inglés *T cell receptor*), y eliminar a células que presentan los antígenos tumorales mediante la liberación de granzimas, perforinas, y la secreción de citoquinas, tales como TNF- α e IFN- γ que favorecen la acción del sistema inmune. Clínicamente, la infiltración intratumoral de linfocitos T citotóxicos se asocia con parámetros clínicos favorables como recurrencia disminuida de la enfermedad y

mayor supervivencia en pacientes con distintos tipos de cáncer (Mahmoud y col., 2011. Dudley y col., 2002). En el caso del cáncer colorrectal, se ha reportado que un aumento en la infiltración de linfocitos T citotóxicos en el estroma del tumor y una mayor razón entre linfocitos T CD8⁺ citotóxicos respecto a linfocitos T CD4⁺ reguladores está asociado a un buen pronóstico, independiente del estadio de la enfermedad (Kim y col., 2015). Además, se ha demostrado el potencial de linfocitos T antitumorales de eliminar y prevenir la aparición de tumores en modelos animales (Amedei y col., 2011). Todo lo mencionado anteriormente da cuenta de una estrecha relación entre sistema inmune y el desarrollo de distintos tipos de cánceres.

Transferencia adoptiva de Linfocitos T como terapia contra el cáncer

Se han desarrollado diversas estrategias para aprovechar la capacidad de los linfocitos T de reconocer y eliminar tumores. Una de las inmunoterapias desarrolladas con linfocitos T consiste en la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos específicos, aislados de biopsias de tumores (TIL del inglés *Tumor-infiltrating lymphocytes*) y amplificados *in vitro*. Esta aproximación ha demostrado ser eficaz en el control de la enfermedad en pacientes con melanoma metastásico, neuroblastoma o tumores generados por infecciones virales, proporcionando así pruebas directas de la eficacia de los linfocitos T citotóxicos manipulados *ex vivo* como inmunoterapia antitumoral (Amedei y col., 2011. Dudley y col., 2002. Pule y col., 2008. Fujita y col., 2008). Sin embargo, la principal limitación de esta estrategia es la necesidad de obtener una biopsia accesible y suficientemente grande que permita la expansión de linfocitos T antitumorales, los que normalmente se encuentran en baja frecuencia (Radvanyi y col., 2015). Por otro lado, a pesar de que los linfocitos T tienen la capacidad de eliminar células tumorales, los antígenos que expresan las células

cancerígenas son propios y los linfocitos T con un TCR que reconoce antígenos propios con alta afinidad son eliminados durante el proceso de tolerancia central con el fin de evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En consecuencia, los linfocitos T endógenos que posee un paciente reconocen con baja afinidad antígenos tumorales propios, lo que se traduce en una respuesta débil e insuficiente (McGranahan y col., 2016).

Para sobrepasar esta limitación, se han desarrollado protocolos de modificación genética de linfocitos T con TCRs que reconocen antígenos tumorales con alta afinidad. Esta metodología permite cambiar la especificidad de los linfocitos T al introducirles genéticamente un TCR previamente caracterizado como antitumoral para que el linfocito T modificado sea capaz de atacar células cancerosas eficientemente. Sin embargo, la utilización de linfocitos T modificados genéticamente con TCR posee una serie de limitaciones. Primero, las cadenas α y β del TCR introducido compiten con las cadenas α' y β' del TCR endógeno preexistente, lo que se traduce por un lado en la disminución de la densidad de TCRs antitumorales (Okamoto y col., 2009), por otro lado la combinación de las cadenas del TCR endógeno y el TCR transgénico puede generar nuevos TCR (α/β' y α'/β) con especificidades desconocidas potencialmente riesgosas (Bendle y col., 2010). Además, dado que el TCR reconoce específicamente a un complejo formado por el péptido antigénico y la molécula de MHC, un TCR en particular sólo sirve para aquella fracción de los pacientes que expresen la molécula de MHC reconocida por el TCR transgénico escogido, lo que restringe la proporción de pacientes que puede beneficiarse de este tipo de terapias. Por último, muchos tumores disminuyen la expresión de las moléculas de MHC como un mecanismo de evasión al reconocimiento por los linfocitos T (Fehlker y col., 2014) limitando el potencial de esta aproximación.

Linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos (Chimeric antigen receptor, CAR)

Una estrategia que supera todas las limitaciones expuestas anteriormente es la modificación genética de linfocitos T con “receptores de antígeno quiméricos” (CARs del inglés *chimeric antigen receptors*). Estos receptores de cadena simple están compuestos por una porción extracelular proveniente de los fragmentos variables de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo (scFv del inglés *chain variable fragment*), seguido por una secuencia espaciadora, fusionado con los dominios citoplasmáticos de señalización proveniente de la molécula CD3 ζ y de moléculas coestimuladoras (como CD27, CD28, OX40 y 4-1BB) (Cartellieri y col., 2010). El CAR reconoce su antígeno en la superficie de la célula tumoral blanco a través del scFv, lo que inicia la transducción de señales al interior de los linfocitos T vía CD3 ζ , de forma similar como ocurriría a través del TCR, desencadenando su activación y la secreción de citoquinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α , además de la liberación de mediadores citotóxicos como perforina y granzima que culminan con la destrucción de la célula blanco (Haynes y col., 2002). En consecuencia, linfocitos T genéticamente modificados con CARs reconocen los antígenos presentes en la superficie de las células tumorales de manera independiente de las moléculas de MHC. Así, un CAR puede ser usado en cualquier paciente, independiente de las moléculas de MHC que presente. Además, al estar formado por una cadena única los CARs no compiten con los TCRs endógenos preexistentes superando las limitaciones asociadas con el uso de TCRs.

Los dominios de receptores de coestimulación presentes en los CARs ayudan a generar una activación robusta, además de promover la sobrevivencia *in vivo* de los linfocitos T modificados. Algunos de los dominios de coestimulación comúnmente utilizados en los CAR son OX40 y CD28, los cuales difieren en las cascadas de

señalización que activan y por lo tanto, en las características de los linfocitos T efectores y en la generación de linfocitos T de memoria. OX40 actúa reclutando a TRAF (factores asociados a receptores de TNF) que a su vez activan la vía canónica y la no canónica de NF- κ B (factor nuclear κ B), NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados), ERK (quinasas reguladas por señal extracelulares) y AP1 (proteína activadora 1), entre otras (Croft y col., 2009). Esto activa las vías de Pi3K (fosfoinositol 3-quinasa) y AKT (o PKB: Proteína quinasa B) lo que favorece la proliferación, liberación de citoquinas proinflamatorias y finalmente la generación de linfocitos T de memoria (Song y col., 2004). CD28 es una proteína de membrana que estimula la activación de los linfocitos T vírgenes promoviendo la proliferación y supervivencia. CD28 media sus funciones a través de dos motivos en su región citoplasmática, YMNM y PYAP. La región YMNM recluta la subunidad p85 de Pi3K, un intermediario para iniciar la vía de AKT que a su vez promueve la proliferación y supervivencia de linfocitos T activando NF- κ B, NFAT, entre otros (Boomer y Green., 2010). Por otro lado, ambos motivos están involucrados en la activación de la proteína quinasa C θ , además del reclutamiento de GBR2 (factor de crecimiento unido a proteína 2) que gatilla la señal para la producción de IL-2. (Hombach y col., 2001). Sin embargo, la liberación de IL-2 tiene efectos contrapuestos, por un lado promueve la proliferación y supervivencia de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ efectores, pero por otro lado activa a los linfocitos T reguladores que infiltran el tumor, lo que deriva en la inhibición de los linfocitos T antitumorales (Cesana y col., 2006). Por ello, se han diseñado estrategias para activar a CD28 pero evitar la liberación de IL-2 (Kofler y col., 2011). A pesar de que OX40 y CD28 reclutan proteínas adaptadoras diferentes, la activación de las vías río abajo como AKT y NF- κ B son parcialmente compartidas, sin embargo, aún existen muchas

preguntas de cómo señales individuales inducen una función específica en linfocitos T (Chen y Flies., 2013).

A nivel clínico, las terapias con linfocitos T autólogos genéticamente modificados con CAR han mostrado una gran eficacia en pacientes con cánceres hematológicos, en particular en el tratamiento de leucemias y linfomas. Linfocitos T modificados con un CAR específico contra la proteína CD19, expresada en linfocitos B malignos, han mostrado efectivos en una gran proporción de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Kalos y col., 2011). Similarmente, en otro estudio realizado con 8 pacientes con linfoma de células B, el tratamiento con esta inmunoterapia resultó en la remisión completa en 2 pacientes, otro con remisión parcial y 4 pacientes con estabilización de la enfermedad (Till y col., 2008). Estos estudios demostraron la capacidad de esta estrategia para eliminar grandes números de células cancerosas, donde dos de los tres pacientes tratados mostraron una regresión completa de la carga tumoral. Sin embargo, su eficiencia en el tratamiento de tumores sólidos ha reportado una capacidad antitumoral más limitada aunque con resultados promisorios en neuroblastoma y melanoma. Concretamente, en un estudio realizado con 15 pacientes con melanoma, el tratamiento con la aproximación de linfocitos T autólogos expresando CARs mostró la regresión de focos metastásicos en 2 pacientes (Morgan y col., 2006). Otro estudio también ha utilizado esta aproximación terapéutica en pacientes con neuroblastoma, en el cual 4 de 8 pacientes mostraron regresión parcial o total del tumor (Pule y col., 2008). Actualmente, numerosos estudios que apuntan a la erradicación de tumores sólidos están siendo desarrollados en estudios clínicos de Fase I y II entre ellos, cáncer de mama, de cuello, de próstata, entre otros. (Maus y col., 2014).

Se han realizado estudios clínicos Fase I demostrando la seguridad de la terapia adoptiva de linfocitos T CAR específicos contra el antígeno carcinoembrionario ("Carcinoembryonic antigen", CEA), en pacientes con cáncer colorrectal que presentan metástasis en hígado (Katz y col., 2015). CEA se ha clasificado como uno de los 15 antígenos prioritarios para utilizar como blanco molecular entre los antígenos tumorales descritos (Cheever y col., 2009). Esta es parte de una familia de proteínas de transmembrana involucradas en adhesión celular que inicialmente fue detectado solo en tumores y tejido embrionario, y posteriormente fue detectado en muy bajos niveles en algunas células epiteliales del tracto gastrointestinal de adultos sanos (Hammarstrom y col., 1999; Bannura y col., 2004). Concretamente, CEA es detectado en el 95,5% de los tumores de pacientes con cáncer colorrectal (Tsouma y col., 2010) y en bajos niveles en una fracción de las muestras de colon provenientes de la población sana (7.5 - 12%).

En cuanto a las desventajas del uso de linfocitos T CAR, se ha reportado que esta terapia puede generar efectos adversos severos, principalmente debido a que durante el diseño de los CAR se favorece el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen con alta afinidad antígenos que se expresan en gran densidad en células tumorales, pero que pueden estar en baja densidad en el epitelio normal. Esto conlleva el riesgo de la activación de linfocitos T CAR contra tejidos sanos provocando la destrucción en estos (Liu y col., 2015). Además, la destrucción de un alto número de células tumorales induce una "tormenta de citoquinas" caracterizada por un aumento en la concentración sanguínea de citoquinas proinflamatorias, fenómenos que pueden llevar finalmente a la muerte de un paciente tratado (Maus y col., 2013). Dado estos potenciales riesgos y el limitado éxito en las pruebas clínicas contra la mayoría de los tumores sólidos, se han desarrollado nuevas estrategias para el desarrollo de linfocitos

T CAR para favorecer tanto la destrucción de las células tumorales como evitar efectos secundarios. Para ello se ha estudiado el diseño de CAR basados en anticuerpos de baja afinidad, lo que evita una respuesta en epitelios de baja expresión de la proteína blanco (Liu y col., 2015), transformar con genes que permitan la rápida depleción de los linfocitos T modificados (Budde y col., 2013), favorecer la infiltración de linfocitos T CAR al estroma tumoral (Caruana y col., 2015) o evitar la inactivación de los linfocitos en el microambiente tumoral (John y col., 2013. Leen y col., 2014) con el fin de mejorar su eficacia antitumoral.

Microambiente tumoral

Una de las principales razones de la baja respuesta de las terapias adoptivas contra la mayoría de los tumores sólidos, consiste en los variados mecanismos de inmunosupresión con los que cuentan las células tumorales para evadir el reconocimiento y la actividad efectora de linfocitos T citotóxicos. Por un lado, las células cancerígenas inducen la acumulación de distintas poblaciones inmunes, tales como células mieloides supresoras, macrófagos tipo II y linfocitos T reguladores. Este microambiente tumoral favorece la producción de citoquinas que evitan la respuesta inmune, tales como IL-4, IL-10 y TGF- β , favorece la expresión de moléculas de superficie que evitan la acción de linfocitos T citotóxicos (como PD-L1, PD-L2, FasL etc.) (West y col., 2015) y la expresión de enzimas que eliminan aminoácidos esenciales para el actuar de las células efectoras como la enzimaIDO que elimina el triptófano local y acumula metabolitos inmunosupresores a partir de triptófano (Platten y col., 2012).

Por otro lado, debido a la proliferación descontrolada y a la vascularización desordenada de las células cancerígenas, los tumores no tienen una oxigenación

eficiente en toda su estructura lo que genera zonas de baja concentración de oxígeno (hipoxia). Adicionalmente, la demanda energética del excesivo crecimiento tumoral es sostenido principalmente mediante fermentación láctica, ya que los tumores favorecen la glicólisis aun en presencia de oxígeno fenómeno que se denomina efecto Warburg (Warburg, 1961). Los principales productos de este metabolismo son la producción de ATP y ácido láctico, este último es exportado al medio extracelular el cual se acumula en el estroma producto de la vascularización deficiente de los tumores, llegando a concentraciones de hasta 20 μM (Fischer y col., 2007). Tanto la hipoxia como la acumulación de ácido láctico son dos ejes que suprimen la respuesta inmune de linfocitos T efectores. La acumulación de ácido láctico disminuye la capacidad de estos de producir moléculas efectoras, tales como IFN- γ o IL-2 e inhibe la proliferación de linfocitos T CD8⁺ humanos (Fischer y col., 2007). Los linfocitos T activados aumentan el flujo de sustratos hacia la glicólisis, lo que trae como consecuencia la liberación de ácido láctico al medio extracelular el cuál es exportado mediante cotransporte de protones y el anión lactato, sin embargo, al infiltrar en el estroma tumoral los linfocitos T se enfrentan a un ambiente con altas concentraciones de ácido láctico por lo que son incapaces de exportar sus propios protones produciendo que entren en anergia. Por otro lado, se ha demostrado que uno de los mecanismos de inmunosupresión del ácido láctico contra linfocitos T, es mediante la inhibición de la activación de p38 y JNK/c-Jun, ambos parte de la cascada de señalización inducida por CD3 ζ (Mendler y col., 2012). La inactivación de linfocitos T inducida por ácido láctico es una de las menos estudiadas en modelos tumorales y puede dar cuenta de la baja eficiencia de las transferencias adoptivas de linfocitos T contra tumores sólidos.

Hipótesis

La estimulación de linfocitos T transducidos con receptores quiméricos que señalizan vía OX40 y CD28 tendrán diferentes capacidades de enfrentar el microambiente tumoral inmunosupresor

Objetivos

Objetivo General

Comparar la actividad efectora y el potencial antitumoral de linfocitos T CAR que difieren en su dominio de coestimulación en condiciones que simulan el microambiente de tumores sólidos

Objetivos Específicos

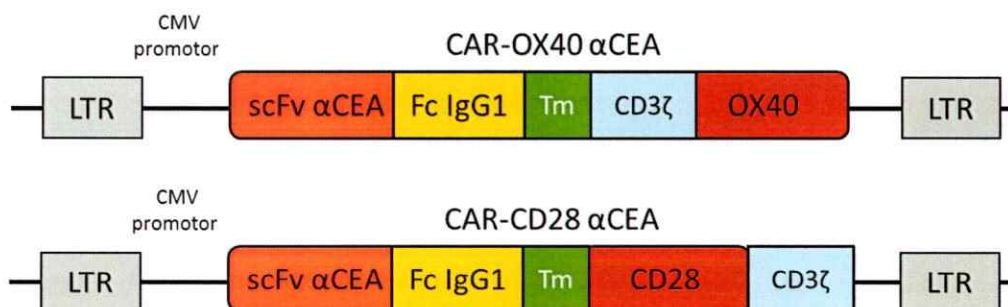
1. Establecer un protocolo eficiente de producción de partículas retrovirales y transducción de linfocitos T con CAR con distinto dominio de coestimulación.
2. Comparación de la supervivencia y activación de linfocitos T CAR *estimulados in vitro* en presencia o ausencia de ácido láctico
3. Comparación *in vitro* en la activación de linfocitos T CAR con células tumorales y su capacidad de eliminación de tumores *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estructura de los receptores de antígeno quiméricos.

Los plásmidos utilizados corresponden al sistema retroviral STITCH, llamados pBULLET (Weijtens y col., 1998) que contienen la secuencia de los CAR flanqueadas por secuencias LTR que permiten la inserción de la secuencia codificante del CAR establemente en el genoma. Se utilizaron dos receptores quiméricos compuestos por la región scFv derivado de un anticuerpo monoclonal SCA431 que reconoce específicamente el antígeno CEA (Bosslet y col., 1985), un dominio espaciador proveniente de la fracción constante de la IgG1 (Fc) seguido de una región de transmembrana proveniente de CD4 murino. El primer receptor quimérico se compone del dominio de señalización CD3 ζ seguido de la región citoplasmática de OX40 (CAR-OX40) mientras que el segundo receptor quimérico utilizado se compone de la región citoplasmática CD28 seguido del dominio de señalización de CD3 ζ (CAR-CD28) como se resume en la Figura 1.

Figura 1: Esquema de los receptores de antígeno quiméricos utilizados



Cultivo celular.

Para el cultivo de las líneas celulares se utilizaron los medios Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco – Life Technologies) de alta glucosa o el medio RPMI 1640, (Gibco - Life Technologies), ambos suplementados con 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco - Life Technologies), 200 μ M de glutamina-alanina (Glutamax, Gibco – Life Technologies), 10 UI/mL de penicilina, 10 μ g/mL de estreptomycin y 25 ng/mL de Fungizone® (Antibiotic-Antimicotic, Gibco – Life Technologies) y 1% de aminoácidos no esenciales (MEM No-essential aminoacids, Gibco – Life Technologies).

Para el cultivo de linfocitos T se utiliza el medio RPMI 1640 suplementado al cual se le adiciona 50 UI/mL de IL-2 humana (Biolegend) y 15 ng/mL de IL-15 murina. (Prepotech)

Transfección de línea celular empaquetadora y obtención de partículas retrovirales no replicativas

La producción de partículas retrovirales no replicativas se realizó utilizando la línea celular Phoenix-Ampho® (ATCC® CRL-3213™) las que expresan establemente las proteína retrovirales env, gag y pol necesarias para la generación de partículas retrovirales no replicativas sin ninguna secuencia empaquetada en su interior. Se sembraron 4×10^5 células en placas de 6 pocillos tratadas para cultivo (Nuncion Delta Surface, Thermo Scientific) cultivadas con medio DMEM suplementado. Después de 24 horas, se llevó a cabo la transfección con los plásmidos que codifican para los receptores quiméricos mediante el método de precipitación con CaCl_2 . Se preparó una solución de HEPES-buffer salino (HBS) 13 mM y por otro lado una solución de CaCl_2 0,25 M a la cual se le agregó 5 μ g de los plásmidos codificantes para el CAR para obtener una concentración final de 37 ng/ μ L. La solución de CaCl_2 conteniendo los



plásmidos fue mezclada lentamente con la solución de HBS e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 270 μL de la solución sobre las células gota a gota de tal forma que la solución que contiene los plásmidos se distribuya en todo el pocillo en ausencia de agitación. Las células fueron incubadas durante 16 horas a 37°C y 5% CO_2 tras lo cual el medio fue reemplazado por medio fresco. El sobrenadante que contiene las partículas retrovirales fue recuperado luego de 48 y/o 72 horas de incubación, este fue filtrado utilizando filtros de 45 μm de membrana de ésteres de celulosa mixtos (Biofil) y guardado a -80°C hasta el día de su utilización. La determinación del porcentaje de células transfectadas se realizó por citometría de flujo (BD FACSCANTO II) y analizado utilizando el programa FlowJo_v10.

Las condiciones de seguridad en la cuales se trabajaron se explicitan en el Manual de Normas de Bioseguridad (CONICYT – 2008) utilizando un gabinete clase II de seguridad biológica (Airstream® Class II Biological Safety Cabinet, - Esco).

Cuantificación de partículas retrovirales no replicativas

El sobrenadante que contiene las partículas retrovirales fue titulado mediante transducción de la línea celular de fibroblasto murino NIH 3T3 (ATCC® CRL-1658™). Para esto, 5×10^5 células NIH 3T3 fueron cultivadas con sobrenadante que contiene las partículas retrovirales no replicativas o medio fresco como control para llegar a un volumen final de 500 μL en placas de 12 pocillos tratadas para cultivo (Thermo Scientific). Las diluciones del sobrenadante con retrovirus respecto al volumen total de transducción fueron de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. Para facilitar la transducción, el medio fue suplementado con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polibreno (bromuro de hexadimetrina, un polícatión sintético que inhibe la repulsión de cargas entre glicoproteínas virales y membrana de la célula blanco) (Davis y col., 2004) y centrifugado por 90 minutos a

1200 g a 32° C. Las células fueron incubadas durante 16 horas y luego se cambió el medio por medio fresco. Posteriormente, las células fueron incubadas por 48 horas y se realizó la medición de la que expresión de la proteína quimérica en la superficie de las células por citometría de flujo (BD FACSCANTO II) y fue analizado utilizando el programa FlowJo_V10. El porcentaje de células transducidas se determinó analizando las células positivas para el marcador, asumiendo que una partícula retroviral infecta una célula, se realizó una curva de titulación graficando el porcentaje de transducción contra la dilución de virus utilizado. Para determinar el número de partículas retrovirales por mL se graficó la curva de titulación y se determinó qué valores en la curva se encuentran en el rango lineal aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{U(virus)}{mL} = \frac{[Número\ de\ células] * [\%\ de\ células\ transducidas]}{mL\ virus\ stock}$$

De los valores obtenidos se calculó el promedio para la estimación de la concentración de partículas retrovirales producido.

Generación de líneas estables productoras de partículas retrovirales no replicativas.

Se sembraron 5×10^5 Phoenix-Ampho en 500 μ L de medio DMEM suplementado junto con 500 μ L de sobrenadante con partículas retrovirales y con 4 μ g/mL de polibreno en placas de 24 pocillos tratadas para cultivo. Las células se centrifugaron por 90 minutos a 1200 g a 32° C. Una vez finalizada la centrifugación las células se incubaron durante 16 horas para luego cambiar el medio por medio fresco. Posteriormente, se incubaron por 48 horas y se midió la expresión del CAR en la superficie de las células por citometría de flujo utilizando un anticuerpo contra la región IgG1 del CAR. Posteriormente, las células positivas para IgG1 fueron seleccionadas

utilizando Cell sorter (FACS Aria II). La recolección de sobrenadante con partículas retrovirales se realizó cultivando 2×10^6 células Phoenix-Ampho transducidas en medio DMEM suplementado en botellas T75 tratadas para cultivo (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific). Cuando el cultivo alcanzó un 70% de confluencia se cambió el medio por 5 mL de medio RPMI 1640, (Gibco - Life Technologies) suplementado. El medio se recolectó luego de 20 horas tras lo cual se procedió a agregar 5 mL de medio RPMI fresco para realizar una segunda recolección luego de 20 horas adicionales. El medio fue filtrado utilizando filtros de 45 μm de membrana de ésteres de celulosa mixtos (Biofil) y guardado a -80°C hasta el día de su utilización con un tiempo máximo de almacenamiento de 2 meses.

Purificación y activación de linfocitos T murinos.

Ratones C57Bl/6 (Jackson Laboratory) del bioterio de la Fundación Ciencia y Vida fueron sacrificados y se obtuvo el bazo de los animales. El bazo fue puesto en etanol e inmediatamente fue depositado en una placa de 60 mm con 5 mL de DMEM estéril y fue perfundido utilizando una jeringa de 25 g (BD Plastipak). Para la purificación de linfocitos T se utilizó un kit de selección negativa basado en anticuerpos acoplados a microesferas magnéticas (Pan T cell purification kit - Miltenyi)

El día previo a la purificación de linfocitos T se agregó a una placa de 24 pocillos no tratada una solución de 500 μL de PBS 1x estéril (Gibco) con anticuerpos anti CD3 y anti CD28 (clones HIT3a y CD28.2 respectivamente, Biolegend) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cada uno, la solución con anticuerpos fue incubada durante 16 horas a 4°C . Finalmente, se agregó 1 mL de medio suplementado durante 20 minutos. Los Linfocitos T obtenidos (aproximadamente 1×10^7 por cada bazo) fueron cuantificados, distribuidos a una concentración de 5×10^5 LT/ml y cultivados en las

placas tratadas con anticuerpos anti CD3 y anti CD28 en 1 mL de RPMI suplementado con 50 UI/mL de IL-2 y 15 ng/mL de IL-15.

Obtención y activación de linfocitos T humanos.

Se obtuvieron 30 mL de sangre de un voluntario sano en tubos con heparina estériles (BD Vacutainer) y se depositó 15 mL en tubos de 50 mL, a cada tubo se le agregó 15 mL de PBS 1x a temperatura ambiente, luego se agregó 5 mL de Ficoll-Paque® ($\delta=1,077$ g/ml; GE Healthcare) lentamente por la pared del tubo. Se centrifugó durante 30 minutos a 900g a temperatura ambiente a una aceleración media y desaceleración sin freno para permitir la separación de las fases. Finalizada la centrifugación se extrajo el halo blanco de la columna ubicado entre el plasma y los eritrocitos que corresponde a las PBMC (Células Mononucleares de Sangre Periférica). Estas fueron lavadas con PBS 1x y centrifugando a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente 3 veces tras lo cual las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 100 UI/mL de IL-2 humanizada y 100 ng/mL de anticuerpo contra CD3 ζ (clon OKT3). Luego de 48 horas, las células no adheridas a la placa o linfocitos de Sangre Periférica (PBL) fueron obtenidos, lavados y puestos en medio fresco RPMI 1640 suplementado con 100 UI/mL de IL-2 humanizada.

Transducción de linfocitos T con partículas retrovirales.

A una placa de 24 pocillos no tratada (Runlab) se agregó 350 μ L de una solución buffer fosfato salino (PBS) con retronectina (Takara) a una concentración de 12 μ g/mL y se incubó durante 16 horas a 4°C. Luego la placa se bloqueó con 1 mL de medio RPMI suplementado, al finalizar el bloqueo el medio fue removido se agregó 1 mL de sobrenadante con partículas retrovirales o medio fresco como control negativo.

Las partículas retrovirales en la placa recubierta con retronectina se centrifugaron a 2000 g durante 90 minutos a 32°C, se eliminó el medio y se agregó 500 µL sobrenadante con partículas retrovirales o medio fresco y 500 µL de linfocitos T activados para obtener una concentración final de 5×10^5 LT/mL en medio RPMI suplementado y con 50 UI/mL de IL-2 y 15 ng/mL de IL-15. La placa con linfocitos T fue centrifugada a 1200 g por 90 minutos a 37°C, al finalizar la centrifugación las células fueron mantenidas en cultivo por 16 horas tras lo cual el medio fue reemplazado por RPMI fresco suplementado con citoquinas. Se evaluó la expresión de los receptores quiméricos en la superficie de los linfocitos T luego de 24, 48 horas y/o 72 finalizada la transducción mediante citometría de flujo (BD FACSCANTO II).

Estimulación de linfocitos T murinos transducidos.

Se agregó proteína CEA purificada (Fitzgerald) a una concentración de 1 µg/mL o BSA (Winkler) a una concentración de 30 mg/mL, cada una diluida en buffer carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6. Se agregó 500 µL de cada solución a placas de 24 pocillos no tratadas (Runlab) los cuales fueron incubados durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, la solución fue removida y la placa fue bloqueada con 500 µL de proteína BSA a 30 mg/mL durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución de bloqueo fue removida y fueron agregados 500.000 linfocitos T transducidos o linfocitos T sin transducir en 1 mL de medio RPMI suplementado con citoquinas los cuales fueron incubados en la placa durante 24 horas a 37°C. Para los experimentos con ácido láctico, la activación de linfocitos T con proteína CEA se realizó en medio RPMI al cuál se le agregó 10 nM de ácido láctico (Sigma) o medio fresco según corresponda.

Luego de 19 horas de activación, se agregó al medio 50 µL de la solución con 0,25 µL de GolgiPlug BD (Brefeldin A) y se incubó durante 5 horas, se realizó una

tinción de superficie seguido de una tinción intracelular y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T transducidos, viabilidad, presencia de marcadores de activación y producción de citoquinas.

Co-cultivo de células tumorales con linfocitos T CAR murinos.

Se sembraron 50.000 células tumorales en placas de 24 pocillos, luego de 24 horas el medio fue removido y se agregó 500.000 linfocitos T transducidos o control en 1 mL de medio RPMI suplementado con citoquinas los cuales fueron incubados en la placa durante 24 horas a 37°C. Luego de 19 horas de activación, se agregó al medio 50 µL de la solución con 0,25 uL de GolgiPlug BD (Brefeldin A) y se incubó durante 5 horas, finalmente, se realizó una tinción de superficie seguido de una tinción intracelular y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T transducidos, viabilidad, presencia de marcadores de activación y liberación de citoquinas.

Tinción de células para citometría de flujo.

Las células a analizar se centrifugaron durante 5 minutos a 400g, se eliminó el sobrenadante y fueron lavadas con 200 µL de una solución de PBS 1x y 2% de suero fetal bovino, luego estas fueron incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad en 50 µL de una solución de PBS-SFB 2% con los anticuerpos a utilizar. Para evaluar la expresión del CAR tanto en líneas celulares como en linfocitos T se utilizó el anticuerpo anti IgG1 conjugado a Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 647 (Abcam) y un marcador de viabilidad Zombie Aqua (Biolegend), adicionalmente se analizaron marcadores específicos de linfocitos T murinos como anti CD3 conjugado a PercP/Cy5.5 (clon 17A2, Biolegend), anti CD8 conjugado a Bv421 (clon 53-6.7, Biolegend), anti CD4

conjugado a PE/Cy7 (clon RM4-5, Biolegend), anti CD69 conjugado a APC/Cy7 (clon H1.2F3, Biolegend) o marcadores de linfocitos T humanos como anti CD3 conjugado a Alexa Fluor 488 (clon Oki4, Biolegend), anti CD8 conjugado a PE (clon HIT8a, Biolegend), anti CD3 conjugado a PE/Cy7 (clon HIT3a, Biolegend). Para realizar tinciones intracelulares de linfocitos T se procedió a agregar 1µL la solución GolgiplugBD (BD biosciences) por mL de cultivo de linfocitos T y se incubó durante 5 horas. Posteriormente se realizó una tinción de superficie, seguida de un lavado con PBS-SFB 2% y se agregó 100 µL de solución citofix/cytoperm la que se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la oscuridad. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con 100 µL de solución perm/wash (BD biosciences) y se incubaron en una solución de 50 µL de perm/wash con los anticuerpos anti IFN-γ conjugado a Pe (clon XMG1.2, Biolegend) y anti Granzima B conjugado a APC (clon GB11, Biolegend) por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Las células fueron lavadas 3 veces con 100 µL de solución perm/wash y se agregó 200 µL de solución PBS-SFB 2% para ser llevadas al citómetro.

Ensayo de la capacidad antitumoral *in vivo* de linfocitos T CAR.

Se inyectaron de forma subcutánea 600.000 células de la línea celular de cáncer colorrectal murino CT26 que expresan CEA (CT26-CEA) en el flanco derecho de ratones Balb/c de entre 2 y 3 meses de edad. Linfocitos T transducidos o no transducidos fueron lavados 3 veces con PBS 1x centrifugándolos por 5 minutos a 400g, fueron teñidos con azul de tripan 0,4% (Gibco) para evaluar la viabilidad y se contaron en una cámara Neubauer. Luego de 16 días de inyectados los tumores en los animales, se transfirieron de forma intravenosa linfocitos T con una viabilidad superior al 90% en 100 µL de PBS 1x estéril. El primer grupo fue inyectado con $1,25 \times 10^6$

linfocitos T sin transducir, el segundo con $2,5 \times 10^5$ linfocitos T CAR-OX40 ($1,25 \times 10^6$ linfocitos T con una tasa de transducción del 20%) y el tercer grupo con $2,5 \times 10^5$ linfocitos T CAR-CD28 ($1,25 \times 10^6$ linfocitos T con una tasa de transducción del 20%). La medición del tamaño tumoral se realizó 3 veces por semana con un pie de metro considerando el largo y el ancho del tumor para calcular el volumen tumoral con la fórmula: $Volumen = Ancho^2 \times Largo$

Análisis estadístico.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa computacional GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc). La comparación de la expresión de los marcadores de activación *in vitro* se realizó la prueba estadística t de student. La comparación de los volumen tumorales *in vivo* se utilizó un t test multiparamétrico. En todos los casos se fijó el nivel de significancia mínimo en P menor a 0,05.

RESULTADOS

Optimización de la generación de partículas retrovirales utilizando líneas productoras estables.

El primer paso para la transducción de linfocitos T con partículas retrovirales fue la optimización de la producción de éstas. Para ello se transfectó la línea celular empaquetadora de partículas retrovirales Phoenix-Ampho con CaCl_2 . La eficiencia de transfección se evaluó mediante la expresión en la superficie de la región IgG1 de los CAR en el cultivo de Phoenix-Ampho. Se obtuvo porcentajes de transfección de alrededor del 90% respecto al control sin transfectar (Figura 2A). La cuantificación de la producción de las partículas retrovirales se realizó mediante la transducción de la línea celular NIH 3T3 utilizando los sobrenadantes obtenidos en la transfección lo que entregó un valor de $1,7 \times 10^6$ partículas retrovirales por mL (Figura 2D-E).

Con el objetivo de mejorar la producción de partículas retrovirales se procedió a transducir la línea celular Phoenix-Ampho y seleccionar mediante *cell sorting* las células que expresan el CAR en su superficie y que, por lo tanto, generan partículas retrovirales. La transducción de las células Phoenix-Ampho resultó en un 9,7% de células positivas para cada CAR-OX40 y un 2,0% para el CAR-CD28, luego de la separación por *cell sorting* de las células transducidas se obtuvo un 97% de células transducidas para el CAR-OX40 y un 88% para el CAR-CD28 (Figura 2B-C). Al cuantificar los sobrenadantes obtenidos de la línea estable Phoenix CAR-OX40 y compararlo con los producidos por transfección se observó un aumento del título viral a $6,28 \times 10^6$ partículas retrovirales por mL producido por la línea estable en la misma cantidad de horas de acumulación (Figura 2D-E). No se observaron diferencias significativas al comparar el título viral de los sobrenadantes obtenidos por las líneas estables Phoenix CAR-OX40 y Phoenix CAR-CD28 (Figura 2F-G).

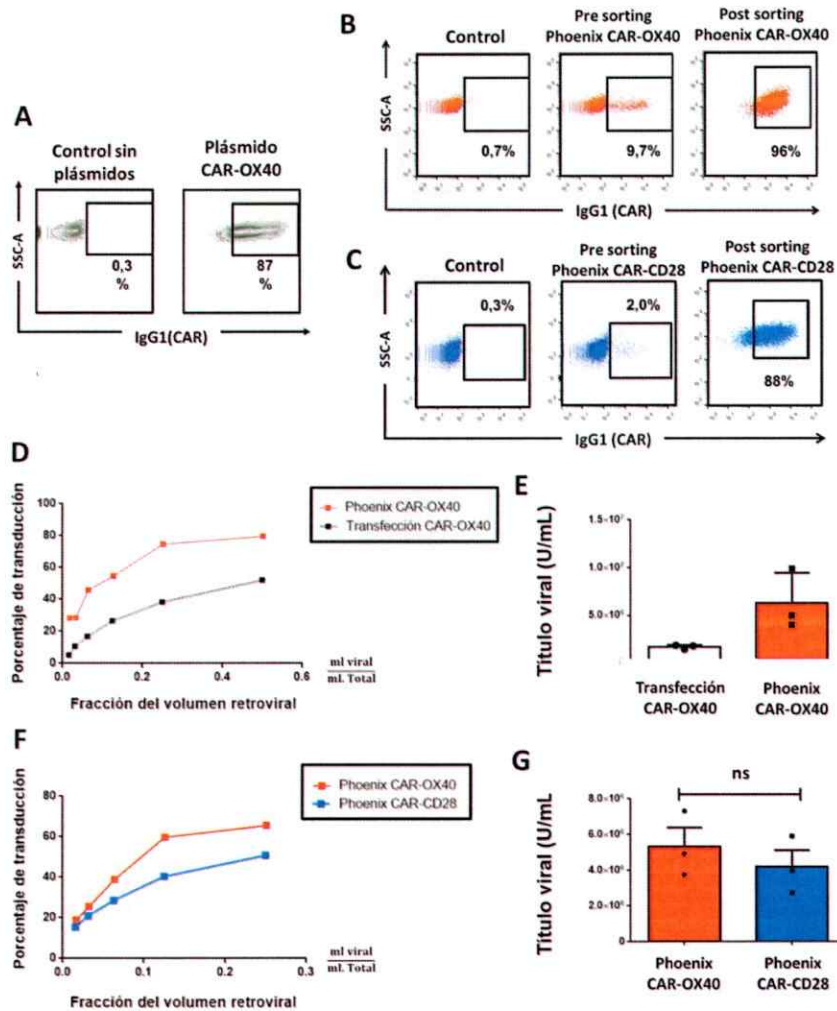


Figura 2. Optimización de la generación de partículas retrovirales utilizando líneas estables productoras. (A) Dot plot representativo de 4 experimentos independientes de transfección utilizando el método de CaCl_2 analizado 24 horas post transfección, como control negativo se utilizan las mismas soluciones de HBS y CaCl_2 sin plásmido. **B-C:** Dot plot de la transducción y cell sorter de la línea productora (B) Phoenix CAR-OX40 y (C) Phoenix CAR-CD28. (D) Curva de titulación viral utilizando sobrenadantes obtenidos por transfección con CAR-OX40 y línea estable Phoenix CAR-OX40. (E) Gráficos de barras que muestran la media \pm S.E.M del título viral obtenido en (D). (F) Curva de titulación viral utilizando sobrenadantes obtenidos por línea estable Phoenix CAR-OX40 y Phoenix CAR-CD28. (G) Gráficos de barras que muestran la media \pm S.E.M del título viral obtenido en (F).

Transducción de linfocitos T murinos y humanos.

Una vez obtenidas las partículas virales, se cultivaron linfocitos T activados con sobrenadante que contiene las partículas retrovirales codificantes para el CAR en presencia de placas cubiertas con retronectina para facilitar la transducción. Luego de dos rondas de transducción se midió la expresión del CAR en la superficie de los linfocitos T murinos utilizando un anticuerpo anti IgG1. Se observó un porcentaje de transducción de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ cercano al 40% luego de 24 horas post transducción, el cual disminuyó a las 48 horas (Figura 3A-C). No se observaron diferencias significativas al comparar el porcentaje de transducción entre los CAR-OX40 y CAR-CD28. Aunque existe una tendencia a disminuir la expresión de los CAR al comparar los porcentajes de transducción luego de 24 y 48 horas, no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar dichos porcentajes.

A partir de una muestra de un voluntario sano, se obtuvieron sus PBL y se sometieron a una ronda de transducción con placas cubiertas con retronectina para cada uno de los CAR. Se observó un porcentaje de transducción cercano al 70% luego de 24, 48, 72 horas en linfocitos T CD8⁺ transducidos con CAR-OX40 y CAR-CD28 (Figura 3D-F). El porcentaje de transducción fue cercano al 50% para linfocitos T CD4⁺ CAR-OX40 y CAR-CD28 (Figura 3D-3F). Se observó una disminución en el porcentaje de transducción de linfocitos T CAR-OX40 entre 24 y 48 horas post transducción. En resumen, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de transducción de linfocitos T con los CAR-CD28 o CAR-OX40.

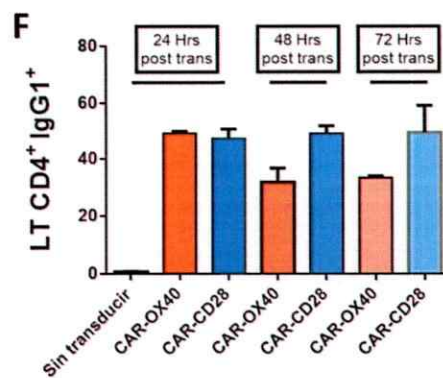
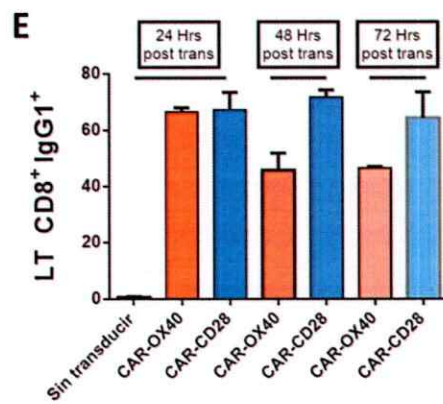
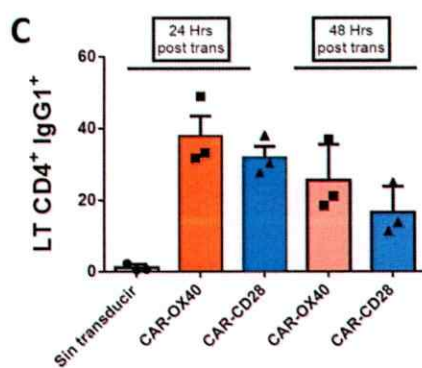
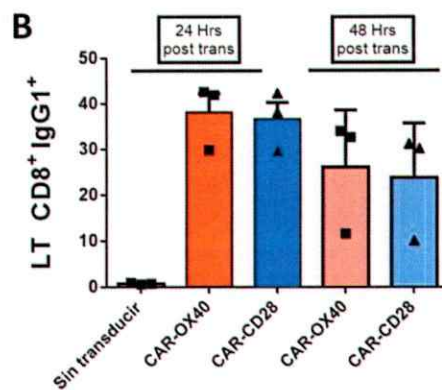
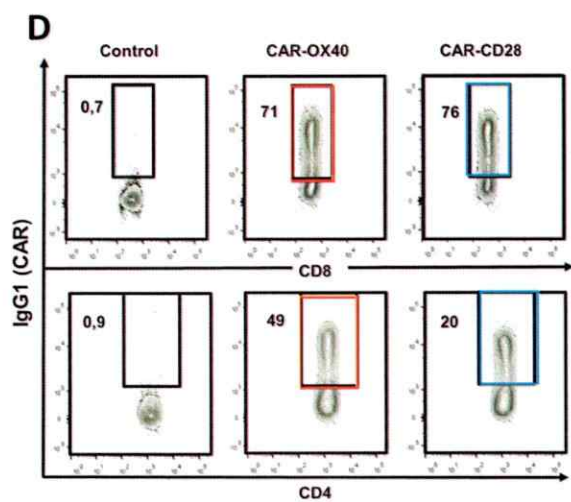
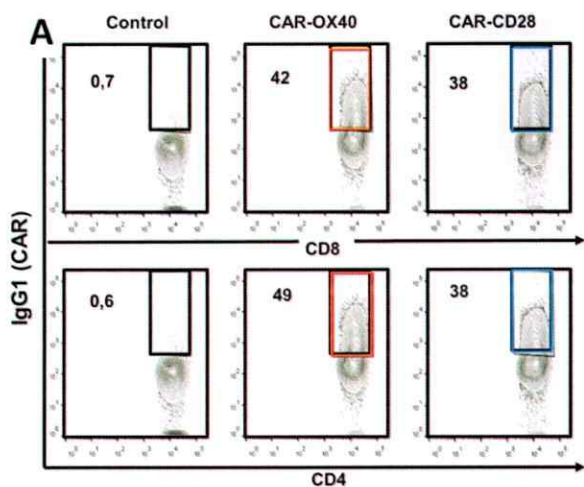
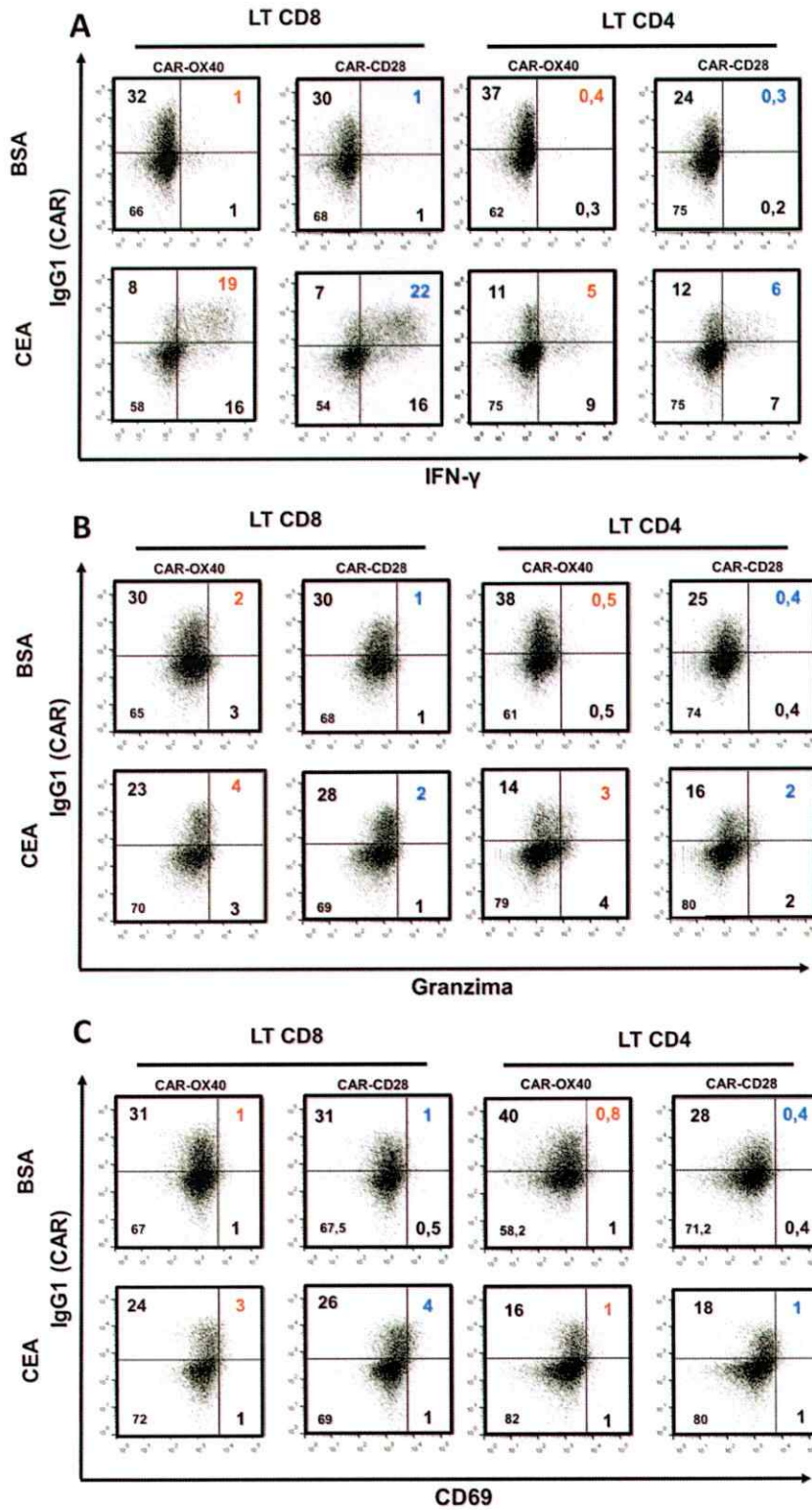


Figura 3. Transducción de linfocitos T murinos y humanos. Linfocitos T activados fueron sometidos a transducción en placas cubiertas con retronectina, el porcentaje de linfocitos T transducidos se analizó por citometría de flujo como la expresión en la superficie de la región IgG1 de los CAR. **A-C:** Linfocitos T obtenidos a partir de bazo de ratones C57BL/6 fueron purificados y posteriormente activados policlonalmente utilizando anticuerpos α CD3 y α CD28 en presencia de 50 U/ml de IL-2 y 50 ng/ml de IL-15. (A) Dot plot representativo de una transducción de linfocitos T murinos para el CAR-OX40 y el CAR-CD28 tanto para linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺. Gráficos de barras que muestran la media \pm S.E.M. del porcentaje de células positivas para IgG1 en la población de linfocitos T (B) CD8⁺ y (C) CD4⁺ 24 y 48 horas post transducción. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes. **D-F:** Los PBL fueron activados policlonalmente utilizando el anticuerpo α CD3 (100 ng/ml) en presencia de 100 U/ml de IL-2. (D) Dot plot de una transducción de linfocitos T humanos para el CAR-OX40 y el CAR-CD28 tanto para linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺. Gráficos de barras que muestran la media \pm S.E.M. del porcentaje de células positivas para IgG1 en la población de linfocitos T CD8⁺ (E) y CD4⁺ (F) 24, 48 y 72 horas post transducción. Se muestran los resultados de un experimento con duplicado de cada condición.

Activación específica contra CEA de linfocitos T CAR murinos.

Para demostrar que los linfocitos T CAR murinos se activan específicamente frente a CEA, se realizó una estimulación *in vitro* donde linfocitos T CAR o control (sin transducir) fueron cultivados en presencia de proteína CEA o BSA unida a placa y se analizó la expresión de marcadores de activación en la superficie celular como CD69, la producción de INF- γ y la molécula efectora granzima B. Cuando los linfocitos T transducidos se cultivaron en presencia de CEA se observó que un porcentaje importante de los linfocitos T CD8⁺ CAR-OX40 y CAR-CD28 producen INF- γ mientras que al ser puestos en BSA no se observó dicha producción (Figura 4A). Esta tendencia es similar a la observada en linfocitos T CD4⁺ donde se observó una activación específica contra la proteína CEA caracterizada por la producción de INF- γ (Figura 4A). En contraste, no se observó la aparición de una población positiva para los marcadores de granzima B (Figura 4B) y CD69 (Figura 4C) en linfocitos T CD8⁺ ni CD4⁺. Se evaluó la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CAR mediante la evaluación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada marcador relativo a la expresión en linfocitos T sin transducir cultivados con proteína CEA. Se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de INF- γ , granzima B y CD69 en linfocitos T CD8⁺ CAR-OX40 y CAR-CD28 (Figura 4D), por otro lado en linfocitos T CD4⁺ se observó un aumento estadísticamente significativo en la IMF de INF- γ , un aumento no estadísticamente significativo de la IMF de CD69 en linfocitos T CAR-OX40 y CAR-CD28 mientras que no se observó expresión de granzima B para ninguno de los CAR (Figura 4E). Finalmente, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los marcadores de activación analizados al comparar tanto los porcentajes de las poblaciones positivas o la IMF relativas de los marcadores de activación entre ambos CAR (Figura 4D-E).



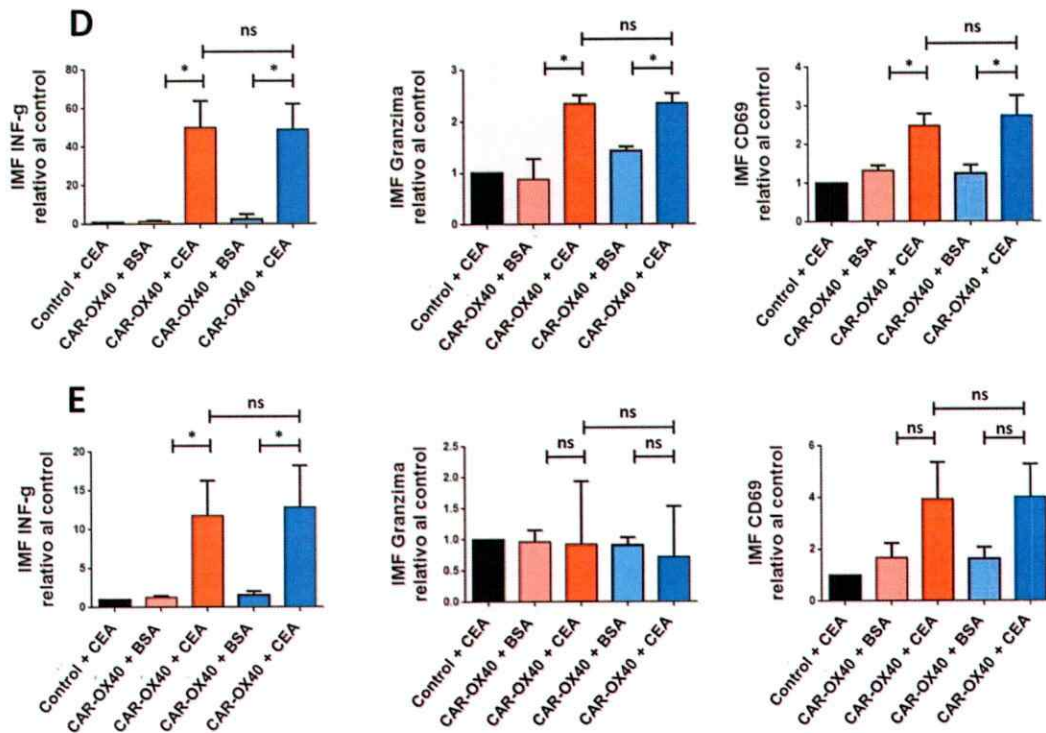


Figura 4. La activación mediada por CD28 u OX40 de linfocitos T CAR no presenta diferencias. Linfocitos T no transducidos y transducidos fueron cultivados en presencia de proteína CEA o BSA. 5×10^5 linfocitos T se cultivaron durante 19 horas en 1 mL de RPMI suplementado con IL-2 e IL-15, luego se le agregó brefeldina A durante 5 horas adicionales. Para evaluar la activación se realizó una tinción para detectar CD3, CD4, CD8, IgG y CD69 además de una tinción intracelular para detectar la presencia de granzima B e IFN- γ en poblaciones de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ analizadas por citometría de flujo. Como control se analizó la fluorescencia de linfocitos T sin transducir en cultivo con proteína CEA (Control + CEA), se comparó la expresión de linfocitos T transducidos en cultivo con BSA (CAR + BSA) y con proteína CEA (CAR + CEA). **A-C:** Dot plots representativos de la producción de IFN- γ (A) Granzima B (B) y la expresión de CD69 (C) en linfocitos T CAR CD8⁺ o CD4⁺. **D-E:** Gráficos de barras que muestran la media \pm S.E.M. de las veces de inducción de la IMF para IFN- γ , Granzima B y CD69 relativo a control sin transducir en presencia de CEA (Control + CEA), tanto en la población de linfocitos T CD8⁺ (D) como CD4⁺ (E). Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes; * = $P < 0,05$; ns= no significativo.

Activación de linfocitos T CAR murinos en presencia de ácido láctico.

La baja respuesta en los ensayos clínicos realizados con linfocitos T CAR contra la mayoría de los tumores sólidos se debe en parte a una incompleta comprensión de la interacción entre los linfocitos T transferidos y el microambiente tumoral inmunosupresor, siendo las altas concentraciones de ácido láctico uno de los desafíos que debe enfrentar un linfocito T antitumoral (Fischer y col., 2007).

Con el fin de estudiar diferencias entre ambos receptores quiméricos en situaciones de estrés que simulen el microambiente tumoral, se activaron linfocitos T murinos cultivados en presencia de proteína CEA en medio con 10 μ M de ácido láctico durante 24 horas. Se observó una disminución en la viabilidad de los linfocitos T, la cual en condiciones basales fue de 80%, mientras que al activarse en presencia de ácido láctico la viabilidad de linfocitos T sin transducir disminuyó a un 4,5%. Los linfocitos T CAR-CD28 alcanzaron una viabilidad del 3,5%, mientras que linfocitos T CAR-OX40 de un 43% (Figura 5A) lo que indica una capacidad de resistir la muerte celular inducida por ácido láctico del CAR-OX40. Al comparar por citometría de flujo los marcadores de activación en la población de linfocitos T CAR-OX40 se observó una drástica disminución en la producción de IFN- γ tanto en linfocitos T CD8⁺ CAR como en linfocitos T CD4⁺ CAR cuando se cultivan en presencia de ácido láctico (Figura 5B). Adicionalmente se analizó la IMF de los marcadores de activación de linfocitos T CAR-OX40, tanto en linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺, se observó una disminución en la IMF de IFN- γ en la condición con ácido láctico, por otro lado la IMF de granzima B y CD69 no se vieron afectadas (Figura 5C). En resumen, la activación mediada por el CAR-OX40 protege parcialmente de la muerte celular y la supresión de la producción de IFN- γ mediada por ácido láctico.

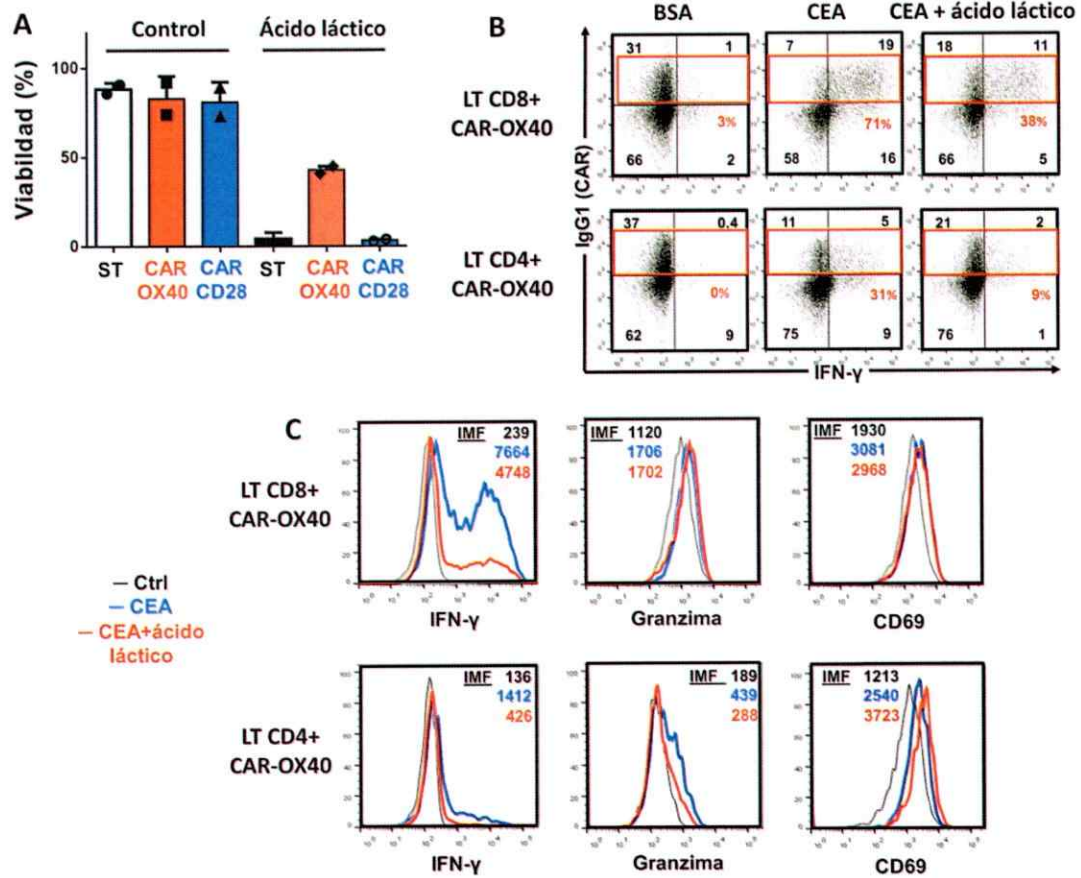


Figura 5. La señalización vía OX40 protege a linfocitos T CAR contra la muerte celular inducida por ácido láctico. Linfocitos T CAR fueron estimulados con proteína CEA o BSA durante 24 horas en presencia o ausencia de ácido láctico. Durante las últimas 5 horas de cultivo se agregó brefeldina A con el fin de detener el tráfico de vesículas. Luego, los linfocitos T fueron recolectados y se analizó por citometría de flujo su viabilidad utilizando la sonda Zombie aqua, la expresión en la superficie del CAR y CD69, además de la expresión intracelular de IFN- γ y granzima B. (A) Gráficos de barras que muestran la media \pm S.E.M. del porcentaje de células vivas. (B) Dot plot representativo de la producción de IFN- γ en presencia o ausencia de ácido láctico en linfocitos T CD8⁺ CAR-OX40 o CD4⁺ CAR-OX40. (C) Histogramas de la producción de IFN- γ , granzima B y CD69 en linfocitos T CAR-OX40 en presencia o ausencia de ácido láctico. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

Activación de linfocitos T CAR murinos con tumores que expresan CEA.

Para evaluar la capacidad de los linfocitos T CAR de activarse en presencia de células tumorales no es suficiente el demostrar su estimulación específica en presencia de su proteína blanco, por ello se evaluó la estimulación de linfocitos T en presencia de células tumorales que expresan CEA. Para ello se procedió a hacer cocultivos de linfocitos T CAR con diferentes líneas celulares que expresaban CEA como la línea de melanoma B16-F10 CEA y la de cáncer colorrectal murino MC38-CEA. Se observó un aumento en la IMF de IFN- γ , granzima y CD69 en ambos linfocitos T CAR activados en presencia de cada una de las células tumorales con respecto al control sin activar (Figura 6A). Al comparar la activación mediada por células tumorales con la activación mediada por proteína CEA purificada tanto en linfocitos T CAR-OX40 como CAR-CD28 se observó una menor producción de IFN- γ al estimular con las líneas celulares, mientras que no se observaron diferencias al comparar la IMF de granzima o de CD69 entre ambas condiciones. Por otro lado, no se observaron diferencias al comparar la activación de linfocitos T CAR-OX40 o CAR-CD28 en ninguna de las condiciones (Figura 6A). Se realizó un ensayo *in vivo* en el cuál se inyectó subcutáneamente células de la línea celular de cáncer colorrectal murino CT26-CEA y luego de 14 días se transfirieron adoptivamente de forma intravenosa 1.250.000 linfocitos T CAR o control sin transducir. Al día 29 post inyección de las células tumorales se observaron diferencias significativas en el volumen tumoral al comparar el grupo transferido con linfocitos T no transducidos con los grupos transferidos con linfocitos T CAR. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos CAR-OX40 con CAR-CD28 (Figura 6B).

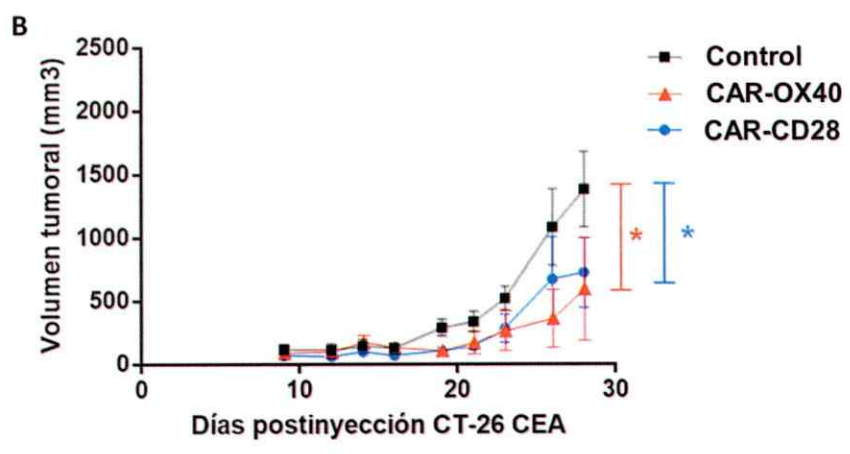
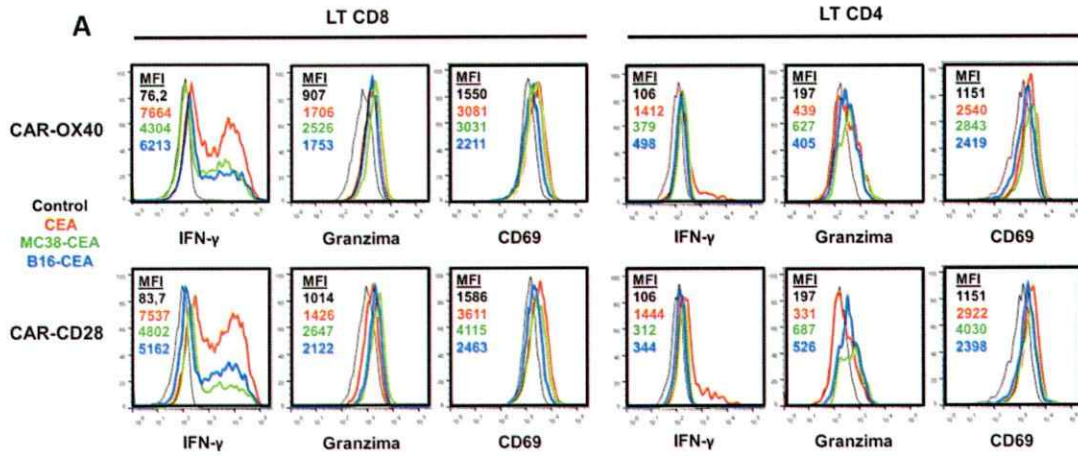


Figura 6. Reconocimiento y eliminación de tumores que expresan CEA por linfocitos T CAR. (A) Histogramas representativos de linfocitos T CAR que fueron estimulados durante 24 horas con proteína CEA (rojo), BSA (negro), las líneas celulares B16 F10 CEA (azul) o MC38-CEA (verde). Durante las últimas 5 horas se agregó al medio brefeldina A. Luego los linfocitos T fueron recolectados y se analizó por citometría de flujo su viabilidad con la sonda Zombie aqua, la expresión en la superficie del CAR y CD69, además de la expresión intracelular de IFN- γ y granzima B. (A) Histogramas representativos de la producción de IFN- γ , granzima B y CD69 en linfocitos T CAR CD8⁺ o CD4⁺. N = 2 (B) Análisis de modelo terapéutico de desarrollo de tumores en ratones tratados con linfocitos T que expresan los CAR. Grupo control de linfocitos T no transducidos (negro), inyectado con linfocitos T CAR-OX40 (rojo) e inyectados con linfocitos T CAR-CD28 (azul). Para cada uno de los linfocitos T CAR se obtuvo un 20% de eficiencia de transducción (equivalente a inyectar $2,5 \times 10^5$ linfocitos positivos para el CAR). Se muestra el resultado de 1 experimento, N=1.

DISCUSIÓN

Debido a la gran severidad de los efectos adversos de las terapias convencionales, la búsqueda de tratamientos alternativos contra el cáncer ha sido uno de los grandes focos de la investigación biomédica en las últimas décadas. Dada la constante acumulación de conocimiento en torno a las características genéticas de distintos tipos de tumores y a su relación con el sistema inmune, se ha abierto la posibilidad de desarrollar múltiples inmunoterapias que exploten estos conocimientos. Dentro de las inmunoterapias más promisorias en desarrollo se encuentra el tratamiento con linfocitos T modificados con CAR. En este trabajo se estableció un protocolo eficiente de transducción de linfocitos T necesario tanto para el desarrollo de investigaciones que apunten a la generación de nuevas terapias contra el cáncer como de investigación básica sobre el funcionamiento de los CARs. La baja respuesta en el tratamiento de la mayoría de los tumores sólidos, en contraste con los resultados obtenidos para cánceres hematológicos, ha despertado un gran interés en que el estudio del funcionamiento de los receptores quiméricos y su relación con el microambiente tumoral. Por otro lado, se está investigando el papel que los distintos dominios que componen a los CARs con el fin de optimizar la destrucción de tumores y evitar los efectos secundarios asociados a la terapia. Una de estas discusiones se basa en qué dominios de coestimulación utilizar debido a que la estimulación de linfocitos T CAR que contienen diferentes dominios de coestimulación difieren en sus capacidades citotóxicas, de persistencia y finalmente en su capacidad antitumoral, siendo CD28, 4-1BB y OX40 los dominios más estudiados.

Generación del protocolo de transducción

Según los creadores de la línea celular Phoenix-Ampho, la capacidad máxima de producción de dicha línea es de 10^7 partículas virales por mL, sin embargo, con las técnicas de transfección utilizadas sólo se alcanzó una producción de 1×10^6 partículas virales por mL, incluso cuando la eficiencia de transfección rondaba el 90%. Por ello, se decidió optar por la alternativa de generar una línea estable productora de partículas retrovirales. Esta tiene como ventajas la eliminación de la transfección para cada ronda de producción de retrovirus, y un aumento en la concentración de retrovirus por mL obtenidos. Con la generación de la línea estable se obtuvieron concentraciones de entre 3 a 5×10^6 partículas por mL, aún por debajo del máximo de 10^7 . Una solución para aumentar la producción es la generación de clones de la línea estable generada, de tal forma que se selecciona el clon más eficiente en la producción y con ello obtener títulos virales cercanos al máximo reportado.

Por otro lado, la principal desventaja técnica del uso de γ -retrovirus es la necesidad de tener linfocitos T en activa proliferación para permitir la infección de los retrovirus eliminando la posibilidad de transferir linfocitos T vírgenes los cuales tienen un mayor capacidad antitumoral (Gattinoni y col., 2005). Una forma de activar linfocitos T humanos es utilizando el anticuerpo de activación contra CD3 (clon OKT3) en solución en presencia de IL-2 lo que activa los linfocitos T y los polariza a un fenotipo efector (Hombach y col., 2001). Mientras que la activación de linfocitos T murinos requiere anticuerpos contra CD3 y CD28 además de la presencia de IL-2 humanizada, cabe mencionar que no existe un consenso respecto a la forma más eficiente de activar linfocitos T, ni las citoquinas a utilizar. Algunos autores recomiendan el uso de IL-7 y/o IL-15 en vez de IL-2 en los cultivos para entregar capacidades de persistencia a los linfocitos T transducidos (Xu y col., 2014) y se ha asociado que la transferencia



de linfocitos T con un fenotipo de mayor persistencia se correlaciona con una mayor eficacia antitumoral (Gattinoni y col., 2005. Zhao y col., 2015).

Con el protocolo estandarizado se logró una tasa de transducción de linfocitos T murinos cercana al 40% al hacer el análisis luego de 24 horas valor que disminuye al 25% luego de 48 horas post transducción lo que significa una disminución del 60% de la expresión del CAR cada 24 horas. Este fenómeno ha sido reportado previamente en otros trabajos (Inaguma y col., 2014) donde el CAR es internalizado cuando un linfocito T está activado, a pesar que al día 4 post activación no se observó que los linfocitos T CAR en presencia de proteína control estuvieran activados. La disminución en el porcentaje de transducción de los linfocitos T debe ser estudiada, especialmente si existen proyecciones clínicas. Esta disminución en la expresión del CAR en la superficie no ocurrió en linfocitos T humanos donde sólo el CAR-OX40 presenta una disminución en la expresión que pasa del 70% al 45% en linfocitos T CD8⁺ y del 50% al 30% en linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, estos experimentos se realizaron utilizando los CAR murinos que están disponibles en el laboratorio ya que el objetivo de dicho experimento era evaluar la capacidad de transducción en linfocitos T humanos, para hacer un análisis comparativo entre ambos CAR es necesario generar líneas estables de las versiones humanizadas de estos.

Importantemente, en la comparación entre los CAR-OX40 y CAR-CD28 no existen variaciones significativas en el porcentaje de transducción de ambos receptores a pesar de que si existe una variación en el porcentaje de células empaquetadoras de cada uno de los retrovirus, Phoenix CAR-OX40 alcanza un 96% de células productoras mientras que Phoenix CAR-CD28 sólo un 88%, por lo que era esperable una diferencia en los porcentajes de transducción de linfocitos T. La ausencia de diferencias en la transducción de linfocitos T con los CAR era un objetivo de gran importancia en este

trabajo ya que permite validar las posibles diferencias en la activación ambos CARs.

Comparación de la activación de linfocitos T CAR

Al comparar la estimulación con proteína CEA *in vitro* no se observaron diferencias significativas en los marcadores de activación evaluados por citometría de flujo los cuales incluyen la producción de IFN- γ , granzima B y la expresión de CD69 entre ambos CAR en ninguna de las condiciones analizadas. De los marcadores de activación analizados, no se observó la aparición de una población CAR⁺ CD69⁺ o un aumento significativo en la IMF en linfocitos T CD4⁺ posiblemente debido a que el protocolo de activación utilizado mantiene una expresión basal de CD69 a los tiempos analizados (Zimmerman y col., 2010).

Estudios previos han comparado las capacidades citotóxicas y la producción de citoquinas *in vitro* de estas construcciones en modelo de linfocitos T humanos (Hombach y col., 2011). En ese estudio los autores observaron que los linfocitos T CAR-CD28 tienen *in vitro* una mayor tasa de proliferación y una producción superior de IL-2 que su contraparte CAR-OX40, considerando un receptor quimérico superior a otro basándose sólo en estas capacidades, obviando otras características que actualmente se están estudiando y dejando de lado estudios comparativos *in vivo*. Por ello, se decidió comprar la estimulación de linfocitos T CAR en presencia de ácido láctico que alcanza altas concentraciones en el microambiente tumoral.

La relación entre el ácido láctico y los linfocitos T ha sido estudiada principalmente por la capacidad inmunosupresora del ácido láctico, especialmente en un contexto tumoral. Altas concentraciones de ácido láctico produce en linfocitos T CD8⁺ humanos la disminución de la producción de diversas citoquinas y factores solubles como IL-2, IFN- γ y granzima B, pero no la expresión de moléculas de

superficie involucradas en la activación como CD25 y CD69 (Fischer y col., 2007). La disminución en el porcentaje de células productoras de IFN- γ en los linfocitos T CAR-OX40, tanto CD8⁺ como CD4⁺, y que la expresión de CD69 no se vea afectada por la activación en ácido láctico son resultados esperados de acuerdo con lo reportado. Sin embargo, no hubo una disminución significativa en la producción de granzima B por parte de los linfocitos T CD8⁺, lo cual puede explicarse por la baja expresión de granzima B en los tiempos analizados, lo que impediría observar esta supresión. Importantly, la magnitud del efecto 10 μ M de ácido láctico de los linfocitos T murinos difiere de lo reportado (Fischer y col., 2007), donde concentraciones tan altas como 20 μ M en cultivo logran la inhibición casi total de la producción de citoquinas, en cambio el efecto encontrado en este seminario de título es la muerte de la mayoría de los linfocitos T. Las principales diferencias entre estos trabajos pueden deberse a los modelos utilizados, en estudios previos (Fischer y col., 2007, Mendler y col., 2012, Haas y col., 2015) se utilizaron linfocitos T CD8⁺ humanos mientras que en el presente se utilizaron linfocitos T murinos CD8 y CD4 en conjunto, además de diferir en los tiempos y la forma de estimulación de los linfocitos T.

La capacidad de resistir altas concentraciones de ácido láctico conferida por el CAR-OX40 tiene varias explicaciones posibles, ninguna de las cuales pudo ser abordada con los experimentos y marcadores utilizados en este trabajo; una de ellas es que la activación mediada por CD28 sea de mayor potencia que una mediada por OX40, como resultado la activación mediada por CAR-CD28 produciría linfocitos T más sensibles a insultos que induzcan apoptosis, esto debido a que una activación de mayor potencia de linfocitos T CAR los hace altamente susceptibles a muerte celular inducida por activación (AIDC) (Hombach y col., 2013). Un experimento para medir dichas diferencias consiste en estimular linfocitos T CAR durante 24 horas y evaluar

mediante anexina V y 7-AAD el porcentaje de linfocitos T que entren en apoptosis temprana. Otra posible explicación es que la activación mediada por CD28 favorezca la glicólisis y la fermentación láctica como forma de obtención de energía en mayor medida que activación mediada por OX40, de esta forma al producir mayores cantidades de ácido láctico sería más sensible a la inactivación y muerte celular al no poder exportar los protones y el anión lactato al medio extracelular. Para evaluar esto es posible hacer estudios de flujos metabólicos utilizando el equipo Seahorse, el cual mide la tasa de acidificación del medio (medida de flujos metabólicos por fermentación) y el consumo de oxígeno (medida de flujos metabólicos por respiración celular) con el fin de evaluar los perfiles metabólicos de activación de linfocitos T activados con el CAR-CD28 o CAR-OX40. La hipótesis de las diferencias metabólicas entre diferentes receptores quiméricos fue validada recientemente. En dicho trabajo, linfocitos T CD8⁺ humanos activados con un CAR-CD28 favorecen la glicólisis y la formación de linfocitos T de memoria efectora, mientras que linfocitos T activados con un CAR-41BB mostraron un aumento en su capacidad de realizar respiración y favorece la acumulación de linfocitos T de memoria central (Kawalekar y cols., 2016).

A pesar de la notable diferencia entre ambos CAR al enfrentarse a un estrés inducido por ácido láctico, no se observaron diferencias en la activación en presencia de células tumorales *in vitro* ni su capacidad antitumoral *in vivo*. Se observó una disminución en la activación de las células positivas para el CAR al compararla con la activación utilizando proteína CEA unida a placa, donde la producción de IFN- γ es mucho más alta en esta última condición. Posiblemente esto se deba a que las células tumorales *in vitro* expresan proteínas en su membrana que disminuyen la activación de linfocitos T, por ejemplo la alta expresión de PD-L1. La decisión de utilizar células tumorales en alta confluencia fue basada en intentar simular con la mayor fidelidad

posible la estimulación de linfocitos T ante un tumor sin embargo, existen muchas diferencias entre la estimulación *in vitro* en cultivo cuya artificialidad hace imposible obtener resultados concluyentes, siendo algunas de ellas la alta disponibilidad de oxígeno en el cultivo, la alta cantidad de nutrientes en un medio suplementado con SFB, glutamina y aminoácidos, etc. De todas formas, este experimento permite demostrar que los linfocitos T CAR son capaces de ser activados específicamente en presencia de células tumorales que expresan CEA.

El estudio realizado *in vivo* se diseñó en base a los estudios clínicos realizados en humanos. Se ha reportado que las dosis a transferir a un ser humano varían entre 10^6 y 10^8 linfocitos T por kilogramo, siendo el primer valor el considerado suficiente para evaluar la capacidad antitumoral sin poner en riesgo la vida del paciente debido a la toxicidad de la terapia. Un ratón del bioterio de la Fundación Ciencia & Vida pesa alrededor de 25 gramos por lo que se decidió utilizar la dosis segura en humanos considerando la masa de los ratones : 250.000 linfocitos T CAR positivos, lo que significa, con una tasa de transducción del 20% obtenida en dicho experimento, inyectar $1,25 \times 10^6$ linfocitos T. Existen muchas formas de mejorar conceptualmente el experimento realizado, por ejemplo, realizar un *cell sorter* de linfocitos T CAR para sólo transferir células con capacidad antitumoral, la inyección sistémica de drogas que se utilicen contra el cáncer colorrectal (como 5-fluorouracilo), modelos de metástasis de cáncer colorrectal ya que los pacientes que se someterían a terapias con linfocitos T CAR serían pacientes en fase III o IV, utilizar un ratón que exprese CEA humana en sus tejidos para estudiar el potencial efecto citotóxico de los CARs (Chan y col., 2004), entre otras. Una de las ventajas del modelo utilizado es la posibilidad de estudiar la interacción de los linfocitos T CAR con otras células del sistema inmune, ya que generalmente se realizan estudios con linfocitos T humanos transferidos en ratones

inmunodeprimidos que no dan cuenta de las de interacción entre los linfocitos T transferidos y el sistema inmune del tumor.

Finalmente, existen muchas preguntas respecto al funcionamiento de los linfocitos T CAR ¿Existen diferencias al enfrentar otros insultos del microambiente tumoral? ¿Cuáles son los dominios que dan cuenta de la optimización no sólo de la capacidad citotóxica, sino que de la persistencia en el tiempo? ¿Hay diferencias en términos de infiltración y retención en el estroma tumoral? ¿Qué características genéticas de los tumores se correlacionan con una respuesta clínica objetiva en pacientes a los cuales se aplica esta terapia? El estudio de los CARs en el tratamiento de tumores sólidos avanza rápidamente no solo por el mayor número de ensayos clínicos que se están realizando en la materia, sino también al mayor conocimiento de cómo interactúa el sistema inmune y las células transferidas con el microambiente tumoral.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se generó un protocolo eficiente de generación de partículas retrovirales con el que se obtienen títulos de hasta 5×10^6 partículas retrovirales por mL de cultivo, con este título se alcanzaron porcentajes de transducción de hasta el 40% en linfocitos T murinos y 70% en linfocitos T humanos logrando un protocolo reproducible de transducción de linfocitos T.

Al comparar la activación mediada por los CAR-OX40 y CAR-CD28 no se observaron diferencias significativas en la acumulación de IFN- γ ni granzima B o en la expresión de CD69 en la superficie de los linfocitos T en presencia de proteína CEA unida a placa o con células tumorales que expresan CEA. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en la actividad antitumoral *in vivo* de ambos receptores quiméricos. Considerando todos estos datos, no se observaron diferencias en la transducción o activación de linfocitos T CAR transducidos con el CAR-OX40 u CAR-CD28.

Sin embargo, cuando se activan linfocitos T CAR murinos en presencia de 10 μ M ácido láctico la cuál es una concentración que simulan el microambiente tumoral, la viabilidad de linfocitos T CAR-CD28 disminuye a 4% mientras que en linfocitos T CAR-OX40 a un 40% con lo que sugiere que una activación mediada por CAR-OX40 protege o es menos susceptible a una muerte mediada por ácido láctico. Por otro lado, la activación en presencia de ácido láctico disminuye la producción de IFN- γ en linfocitos T CAR-OX40, mientras que la expresión de CD69 y la producción de granzima B no se ven afectados, dando cuenta de capacidades diferenciadas de resistir el ambiente tumoral inmunosupresor entre ambos CAR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amedei, A., E. Niccolai, et al. (2011). "T cells and adoptive immunotherapy: recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology." *Clin Dev Immunol* 2011: 320571.
2. Bannura, G., M. A. Cumsille, et al. (2004). "[Carcinoembryonic antigen as an independent prognostic factor in colorectal carcinoma]." *Rev Med Chil* 132(6): 691-700.
3. Bendle, G. M., C. Linnemann, et al. (2010). "Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy." *Nat Med* 16(5): 565-570, 561p following 570.
4. Boomer, J. S. and J. M. Green (2010). "An enigmatic tail of CD28 signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(8): a002436.
5. Bosslet, K., G. Luben, et al. (1985). "Immunohistochemical localization and molecular characteristics of three monoclonal antibody-defined epitopes detectable on carcinoembryonic antigen (CEA)." *Int J Cancer* 36(1): 75-84.
6. Budde, L. E., C. Berger, et al. (2013). "Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma." *PLoS One* 8(12): e82742.
7. Cartellieri, M., M. Bachmann, et al. (2010). "Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer." *J Biomed Biotechnol* 2010: 956304.
8. Caruana, I., B. Savoldo, et al. (2015). "Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes." *Nat Med* 21(5): 524-529.
9. Cesana, G. C., G. DeRaffele, et al. (2006). "Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 24(7): 1169-1177.
10. Chan, C. H. and C. P. Stanners (2004). "Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy." *Mol Ther* 9(6): 775-785.
11. Cheever, M. A., J. P. Allison, et al. (2009). "The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research." *Clin Cancer Res* 15(17): 5323-5337.
12. Chen, L. & D. B. Flies (2013). "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition." *Nat Rev Immunol* 13(4): 227-242.
13. Croft, M., T. So, et al. (2009). "The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease." *Immunol Rev* 229(1): 173-191.
14. CONICYT. (2008). "Manual de Normas de Bioseguridad, Segunda Edición". Gobierno de Chile Sitio web: http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/09/articles-30555_recurso_1.pdf
15. Davis, H. E., M. Rosinski, et al. (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." *Biophys J* 86(2): 1234-1242.
16. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* 298(5594): 850-854.
17. Edge, S. B. y. C. C. C. (2010). "The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM." *Ann Surg Oncol* 17(6): 1471-4.
18. Fehlker, M., M. R. Huska, et al. (2014). "Concerted down-regulation of immune-system related genes predicts metastasis in colorectal carcinoma." *BMC Cancer* 14: 64.

19. Fischer, K., P. Hoffmann, et al. (2007). "Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells." *Blood* 109(9): 3812-3819.
20. Fujita, Y., C. M. Rooney, et al. (2008). "Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases." *Bone Marrow Transplant* 41(2): 193-198.
21. Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, et al. (2005). "Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells." *J Clin Invest* 115(6): 1616-1626.
22. Haas, R., J. Smith, et al. (2015). "Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions." *PLoS Biol* 13(7): e1002202.
23. Hammarstrom, S. (1999). "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." *Semin Cancer Biol* 9(2): 67-81.
24. Haynes, N. M., J. A. Trapani, et al. (2002). "Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors." *Blood* 100(9): 3155-3163.
25. Hombach, A., D. Sent, et al. (2001). "T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis." *Cancer Res* 61(5): 1976-1982.
26. Hombach, A. A. and H. Abken (2011). "Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling." *Int J Cancer* 129(12): 2935-2944.
27. Hombach, A. A., A. Holzinger, et al. (2013). "The weal and woe of costimulation in the adoptive therapy of cancer with chimeric antigen receptor (CAR)-redirected T cells." *Curr Mol Med* 13(7): 1079-1088.
28. Inaguma, Y., Y. Akahori, et al. (2014). "Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H." *Gene Ther* 21(6): 575-584.
29. John, L. B., C. Devaud, et al. (2013). "Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells." *Clin Cancer Res* 19(20): 5636-5646.
30. Kalos, M., B. L. Levine, et al. (2011). "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia." *Sci Transl Med* 3(95): 95ra73.
31. Katz, S. C., R. A. Burga, et al. (2015). "Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases." *Clin Cancer Res* 21(14): 3149-3159.
32. Kawalekar, O. U., R. S. O'Connor, et al. (2016). "Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells." *Immunity* 44(2): 380-390.
33. Kim, Y., J. M. Bae, et al. (2015). "Image analyzer-based assessment of tumor-infiltrating T cell subsets and their prognostic values in colorectal carcinomas." *PLoS One* 10(4): e0122183.
34. Kofler, D. M., M. Chmielewski, et al. (2011). "CD28 costimulation impairs the efficacy of a redirected t-cell antitumor attack in the presence of regulatory t cells which can be overcome by preventing Lck activation." *Mol Ther* 19(4): 760-767.
35. Leen, A. M., S. Sukumaran, et al. (2014). "Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor." *Mol Ther* 22(6): 1211-1220.

36. Liu, X., S. Jiang, et al. (2015). "Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice." *Cancer Res* 75(17): 3596-3607.
37. Mahmoud, S. M., E. C. Paish, et al. (2011). "Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer." *J Clin Oncol* 29(15): 1949-1955.
38. Maus, M. V., S. A. Grupp, et al. (2014). "Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies." *Blood* 123(17): 2625-2635.
39. Maus, M. V., A. R. Haas, et al. (2013). "T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans." *Cancer Immunol Res* 1(1): 26-31.
40. Mandler, A. N., B. Hu, et al. (2012). "Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation." *Int J Cancer* 131(3): 633-640.
41. McGranahan, N., A. J. Furness, et al. (2016). "Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade." *Science* 351(6280): 1463-1469.
42. Morgan, R. A., M. E. Dudley, et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." *Science* 314(5796): 126-129.
43. Okamoto, S., J. Mineno, et al. (2009). "Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR." *Cancer Res* 69(23): 9003-9011.
44. Platten, M., W. Wick, et al. (2012). "Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion." *Cancer Res* 72(21): 5435-5440.
45. Prieto, J., C. Qian, et al. (2004). "Biologic therapy of liver tumors." *Surg Clin North Am* 84(2): 673-696.
46. Pule, M. A., B. Savoldo, et al. (2008). "Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma." *Nat Med* 14(11): 1264-1270.
47. Radvanyi, L. G. (2015). "Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy: Addressing Prevailing Questions." *Cancer J* 21(6): 450-464.
48. Rao, B., M. Han, et al. (2011). "Clinical outcomes of active specific immunotherapy in advanced colorectal cancer and suspected minimal residual colorectal cancer: a meta-analysis and system review." *J Transl Med* 9: 17. doi: 10.1186/1479-5876-9-17
49. Siddiqui, I., M. Erreni, et al. (2016). "Enhanced recruitment of genetically modified CX3CR1-positive human T cells into Fractalkine/CX3CL1 expressing tumors: importance of the chemokine gradient." *J Immunother Cancer* 4: 21. doi: 10.1186/s40425-016-0125-1
50. Song, J., S. Salek-Ardakani, et al. (2004). "The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity." *Nat Immunol* 5(2): 150-158.
51. Subsecretaría de Salud Pública. (2013). "Guía clínica AUGE. Cáncer colorrectal en personas de 15 años y más". Ministerio de Salud, Gobierno de Chile Sitio web: <http://www.minsal.cl/portal/url/item/db8329dc44e6371de0400101640126b5.pdf>
52. Till, B. G., M. C. Jensen, et al. (2008). "Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells." *Blood* 112(6): 2261-2271.
53. Tsouma, A., C. Aggeli, et al. (2010). "Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients." *World J Gastroenterol* 16(47): 5965-5974.
54. Warburg, O. (1961). "[On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy]." *Munch Med Wochenschr* 103: 2504-2506.

55. Weijtens, M. E., R. A. Willemsen, et al. (1998). "A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes." *Gene Ther* 5(9): 1195-1203.
56. West, N. R., S. McCuaig, et al. (2015). "Emerging cytokine networks in colorectal cancer." *Nat Rev Immunol* 15(10): 615-629.
57. Xu, Y., M. Zhang, et al. (2014). "Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15." *Blood* 123(24): 3750-3759.
58. Zhao, Z., M. Condomines, et al. (2015). "Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells." *Cancer Cell* 28(4): 415-428.
59. Zimmerman, M., D. Yang, et al. (2010). "IFN-gamma upregulates survivin and lfi202 expression to induce survival and proliferation of tumor-specific T cells." *PLoS One* 5(11): e14076.