



Universidad
de Navarra

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CRIBADO
DE FÁRMACOS PARA IDENTIFICAR NUEVAS
DROGAS CAPACES DE REVERTIR EL
FENOTIPO RESISTENTE DE LAS CÉLULAS
CANCEROSAS A LA DESTRUCCIÓN POR
CÉLULAS CAR-T.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica

Curso 2022-2023

Autor: **Javier Marañón López**

Tutor: Sandra Hervás-Stubbs

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría poder agradecer profundamente a la Dra. Sandra Hervas-Stubs por la increíble oportunidad que me brindo. Ha sido y será mi referente en ciencia y como persona, tras enseñarme su coraje, valentía, fuerza, constancia y excelencia. No tengo palabras para agradecer todo el tiempo que ha dedicado en mi formación, por el trato tan cercano y por permitirme iniciarme en el apasionante mundo de la investigación gracias a enseñarme como adquirir independencia en el laboratorio.

También me gustaría agradecer a Uxua Mancheño y Edurne Elizalde por el tiempo que han dedicado en la enseñanza de las técnicas de laboratorio, así como al Dr. Enrique Conde por toda la ayuda ofrecida. Agradecer también al Dr. Antonio Pineda por cedernos las drogas usadas en mis experimentos.

No me gustaría olvidarme de agradecer a mis padres por la oportunidad de estudiar en la Universidad de Navarra, siento el TFG el culmen de mi paso por esta.

Índice

Resumen

1. Introducción
 - 1.1. Hipótesis
 - 1.2. Objetivos
2. Material y métodos
 - 2.1. Diseño y puesta a punto de las células tumorales
 - 2.1.1. Líneas celulares
 - 2.1.2. Plásmidos y constructos
 - 2.1.3. Producción de retrovirus anfotrópicos e infección de las células tumorales
 - 2.2. Diseño y puesta a punto de las células CAR-T
 - 2.2.1. Plásmidos y constructos
 - 2.2.2. Producción de retrovirus ecotrópicos
 - 2.2.3. Procesamiento del bazo
 - 2.2.4. Aislamiento de linfocitos T CD8⁺
 - 2.2.5. Activación de linfocitos T CD8⁺
 - 2.2.6. Infección de linfocitos T CD8⁺
 - 2.3. Ensayos funcionales
 - 2.3.1. Cocultivos
 - 2.3.2. Ensayos de citotoxicidad
 - 2.3.3. ELISA de IFN γ
 - 2.4. Citometría de flujo
 - 2.5. Estadística empleada
3. Resultados
 - 3.1. Modificación genética de las líneas tumorales para expresar GFP/LUC
 - 3.2. Ensayos de citotoxicidad y estudio de la activación CAR-T para evaluar las células CAR-T (24h/4h)
 - 3.3. Efecto del IFN γ o HITS sobre la citotoxicidad y la producción de IFN γ por el CAR-T
4. Discusión
5. Conclusiones
6. Referencias
7. Anexos

Resumen

En los últimos años, la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) se ha convertido en un tratamiento prometedor para el tratamiento del cáncer. A pesar de este progreso, una proporción significativa de pacientes experimenta resistencia a la terapia CAR-T. Las células cancerosas pueden ser insensibles a la destrucción por las células CAR-T, lo que se conoce como resistencia intrínseca. Esta resistencia intrínseca es responsable de una parte muy significativa del fracaso de este tipo de terapias que afecta a todo tipo de tumores, siendo una dificultad adicional para la eficacia de las células CAR-T en el tratamiento de tumores sólidos. Mucho de los mecanismos de resistencia intrínseca están regulados a nivel epigenético. Recientemente, se han desarrollado y probado varios inhibidores epigenéticos en cáncer. El enfoque principal de la mayoría de los estudios hasta ahora ha sido el efecto citotóxico directo de estos compuestos, y pocos estudios han investigado la capacidad de revertir el fenotipo resistente de las células cancerosas a la terapia CAR-T. Existe la necesidad de una metodología sistemática para identificar nuevas drogas que sensibilicen a la célula tumoral a la destrucción por las células CAR-T. Mediante la expresión de flaying luciferase (*fLuc*) en líneas murinas de tumores sólidos que expresan el antígeno EGFRvIII, hemos establecido un protocolo simple, preciso, sensible y robusto para detectar sensibilizadores epigenéticos. Demostramos la eficacia de nuestro protocolo e identificamos varios inhibidores epigenéticos capaces de sensibilizar a las células tumorales a la destrucción por un CAR anti-EGFRvIII.

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AD	Antígeno diana
Ag	Antígeno
CAF	Fibroblasto asociado a cáncer
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CAM	Cáncer de mama
CT	Célula tumoral
EC	Dominio extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor epitelial de crecimiento
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte
Fc	Fracción constante
FcR	Receptor de la fracción constante
GBM	Glioblastoma
HEV	Vénulas endoteliales altas
IL	Interleuquina
LT	Linfocito T
MDSC	Célula supresora derivada de mielóide
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NT	No transfectada
PB	Pares de bases
PD-L1	Ligando de muerte celular programada 1
PS	Fosfatidilserina
RLU	Unidades relativas de luminiscencia
RV	Retrovirus
RV-DM	Retrovirus “dual modality”
RV-TM	Retrovirus “triple modality”
ScFv	Fragmento variable de cadena única
SI	Sinapsis inmunológica
SRC	Síndrome de liberación de citoquinas
SYTVII	Sensor de calcio de la sinaptotagmina VII
TAA	Antígeno asociado a tumor

TAN	Neutr3falo asociado a tumor
TAM	Macr3fago asociado a tumor
TCA	Terapia celular adoptiva
TCR	Receptor de c3lula T
TIL	Linfocito infiltrante de tumor
TME	Microambiente tumoral
Treg	Linfocito T regulador
TCR	Receptor de c3lula T
TIL	Linfocito infiltrado en el tumor
VH	Regi3n variable de la cadena pesada
VL	Regi3n variable de la cadena ligera

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de los tumores sólidos se ha visto incrementada año tras año en todo el mundo. El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte en el mundo, con casi 10 millones de fallecidos por esta enfermedad en 2020. Siendo el cáncer de mama el más prevalente en mujeres(1). Por este motivo, nuevas estrategias de tratamiento han ido emergiendo con el fin de frenar este incremento en la prevalencia del cáncer.

TERAPIA CELULAR ADOPTIVA CAR-T

En los últimos años, la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer al potenciar el sistema inmunitario del huésped. La terapia celular adoptiva (TCA) se basa en la transferencia de células inmunitarias modificadas para mediar una función antitumoral. Existen tres tipos diferentes de TCA: con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) o con linfocitos T modificados genéticamente con receptores de linfocitos T (TCR) o con receptores de antígenos quiméricos (CAR). (2) La terapia con células CAR-T ha surgido recientemente como una inmunoterapia que ha revolucionado el tratamiento de los tumores hematológicos(3).

El CAR es un receptor de superficie celular sintético que reemplaza el complejo TCR-CD3 y reconoce un antígeno (Ag) diana (AD) de superficie independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esto es una ventaja ya que las células tumorales (CT) expresan a la baja dicha molécula y otras de la maquinaria de presentación y procesamiento de Ags, escapando así de los linfocitos T con TCR. Otra ventaja de los CAR es que pueden reconocer Ags potenciales en casi todas las formas, incluyendo Ags de carbohidratos, lípidos y proteínas(3).

El CAR generalmente se compone de cuatro dominios: dominio de unión a Ag, región bisagra, dominio transmembrana y la región de señalización intracelular(3).

El dominio de unión a Ag generalmente se compone de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de un anticuerpo capaz de reconocer un Ag de membrana. Estas regiones están conectadas a través de un conector flexible formando de este modo un fragmento de cadena única variable (ScFv) la cual determina la especificidad de unión a su Ag. La región bisagra es la región espaciadora que expone el dominio de unión al Ag en la superficie de la célula CAR-T para unirse a los AD. La región bisagra comúnmente utilizada se deriva de CD8, CD28 o la inmunoglobulina G (IgG).

La longitud de la región bisagra se determina empíricamente por la ubicación de los AD, siendo necesaria una bisagra más larga para los Ags próximos a la membrana celular y una más corta para los Ag expuestos en la superficie celular. La función principal del dominio transmembrana es acoplar el CAR en la membrana de la célula inmunitaria. Algunos estudios, sin embargo, muestran que esta región puede afectar la expresión CAR, la estabilidad, la dimerización y la transducción de señales. (4)

Los CAR de primera generación en su región de señalización intracelular presentan únicamente el dominio de señalización CD3 ζ del TCR. El diseño de esta región ha evolucionado a lo largo de los años. Los CAR de segunda y tercera generación están formados, respectivamente, por uno o dos dominios coestimuladores adicionales, de otros receptores, como CD137 (4-1BB), CD28 u OX40. La última novedad son los CAR de cuarta generación (también conocidos como TRUCK), con capacidad de secretar citoquinas tal como IL-12 que potencia la viabilidad del CAR-T y recluta y activa otras células del sistema inmune (3) (5) (Fig.1).

Los receptores CAR se introducen por ingeniería genética en los linfocitos T del huésped mediante vectores virales, como retrovirus y lentivirus, o utilizando sistemas no virales como los transposones. (5)

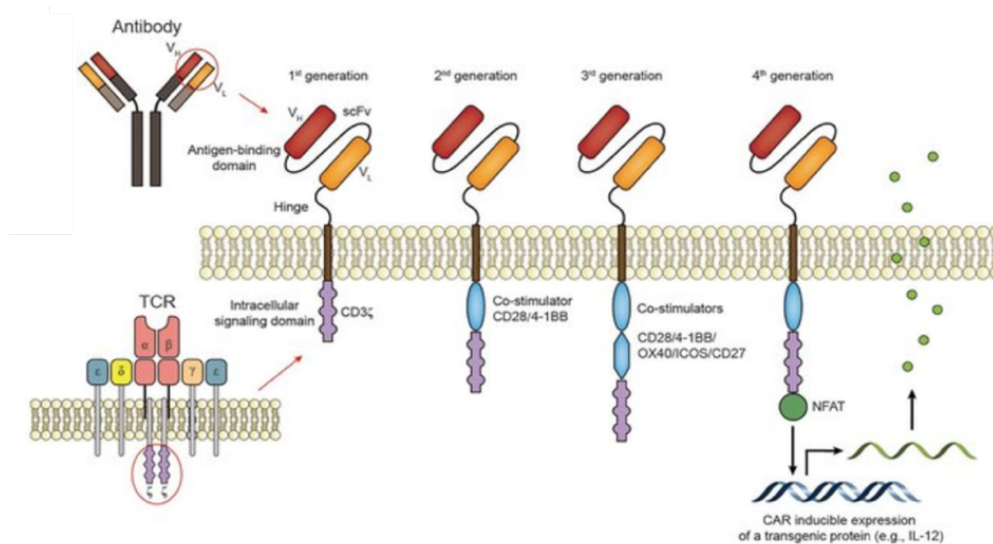


Figura 1: Estructura del receptor de antígeno quimérico y su evolución a lo largo de las diferentes generaciones.(6)

Las células CAR-T con respecto a otras TCA reconocen el Ag diana (AD) de manera independiente al MHC, las células tumorales (CT) expresan a la baja dicha molécula. También el CAR puede reconocer Ags potenciales en casi todas las formas, incluyendo Ags de carbohidratos, lípidos y proteínas. (3)(7)(8)

Toxicidad de la terapia CAR-T y posibles formas de solventarla

Existen tres tipos de toxicidades principales asociada a la terapia CAR-T. (i) “*on-target, on-tumor*”, siendo la toxicidad más común el síndrome de liberación de citoquinas (SRC). Es una reacción inmunitaria asociada a la liberación de citoquinas (IFN γ , IL-6 e IL-10) donde a mayor carga tumoral mayor probabilidad de sufrir SRC. Esta se puede frenar empleando los anticuerpos (Ac) bloqueantes de estas citoquinas. (ii) “*on-target off-tumor*” donde la célula CAR-T ataca las células sanas que expresan el AD. (iii) “*off-target toxicity*”, independiente del Ag, el fragmento extracelular cristalizante (Fc) de los CAR puede interactuar con el receptor Fc (FcR) expresado en células inmunitarias innatas, activándolas. Además, se ha descrito neurotoxicidad, genotoxicidad (derivada del uso de vectores virales integradores para modificar los linfocitos T) e inmunogenicidad. (8)

Dificultades en la aplicación de la terapia CAR-T en tumores sólidos

Actualmente hay seis tratamientos de CAR aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para los tumores hematológicos. Sin embargo, el éxito de la terapia CAR en estos tumores no ha podido ser extrapolable a los tumores sólidos. Las principales barreras de las células CAR-T en los tumores sólidos se pueden dividir en tres categorías: encontrar el tumor, entrar en él y sobrevivir en él. (9)

A. Encontrar el tumor: Ags asociados al tumor, nivel de expresión y susceptibilidad a las células CAR-T.

La primera gran diferencia entre los tumores sólidos y los tumores hematológicos es que es más difícil encontrar un AD ideal. A diferencia de los tumores hematológicos, en los que a pesar de que el AD diana se encuentre en linfocitos B normales (como CD19 y BCMA) la destrucción de estas células no tiene graves efectos, en los tumores sólidos es difícil encontrar un AD exento de toxicidad “*on-target-off-tumor*” grave.

La principales dianas de los CAR en los tumores sólidos son Ag asociado al tumor (TAA), es decir Ag que se expresan preferentemente en los tumores pero también, a niveles bajos, en los tejidos normales. La falta de especificidad de Ags tumorales aumenta el riesgo potencial de una toxicidad significativa en la diana fuera del tumor. En el caso de las células CAR-T, el AD debe expresarse en la superficie de la célula cancerosa para poder ser reconocido. (4)

Sin embargo, sólo alrededor del 27% del total de las proteínas celulares se expresan en la superficie. Esto disminuye drásticamente el número de posibles dianas para la célula

CAR-T en tumores sólidos. Además, los tumores sólidos tienden a mostrar un alto grado de heterogeneidad de Ags. Muchos tumores sólo tienen un subconjunto de células que expresan el AD, pero incluso en el caso de un TAA expresado uniformemente, existe la posibilidad de pérdida de Ag o escape de Ag, en el que el AD desaparece del tumor superviviente. Este fenómeno puede ocurrir en cualquier neoplasia, pero es más frecuente en los tumores sólidos debido a la alta tasa de mutaciones de este tipo de tumores(2)(4).

B. Infiltración tumoral.

Incluso cuando se identifica un AD para un tumor sólido, una célula CAR-T debe ser capaz de llegar al lugar del tumor. En los tumores sólidos, existen múltiples barreras que una célula CAR-T debe superar para llegar al tumor. El desajuste entre quimiocinas y receptores puede impedir que los linfocitos migratorios sigan un gradiente quimiotáctico. La presencia de vasos sanguíneos conocidos como vénulas endoteliales altas (HEV) es fundamental para la infiltración de células T. Sin embargo, estos vasos sanguíneos están distorsionados e inmaduros en muchos tumores sólidos, especialmente en el núcleo del tumor, donde se encuentra el menor número de TIL. Además, existen barreras físicas como los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) (Fig. 2A) que pueden bloquear la entrada de células T(2) (4) (10) .

C. Supervivencia de las CAR-T en el microentorno tumoral.

El microambiente tumoral (TME) se ha caracterizado como hostil para las células T. El metabolismo glucolítico de las CT hace que el entorno sea hipóxico, ácido, bajo en nutrientes y propenso al estrés oxidativo (Figura 2B). En un entorno inflamatorio, las CT a menudo regula al alza ligandos como el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) que se unen a receptores inhibidores de las células T, como PD-1 (Fig. 2A). Además, en el TME existen células supresoras como las células supresoras derivadas de los mieloides (MDSC), los macrófagos asociados a tumores (TAM), los neutrófilos asociados a tumores (TAN) y las células T reguladoras (Treg). (2)(10) Estas células, junto con las CT, secretan factores inhibitorios que favorece el desarrollo del tumor (Fig. 2B) (4)

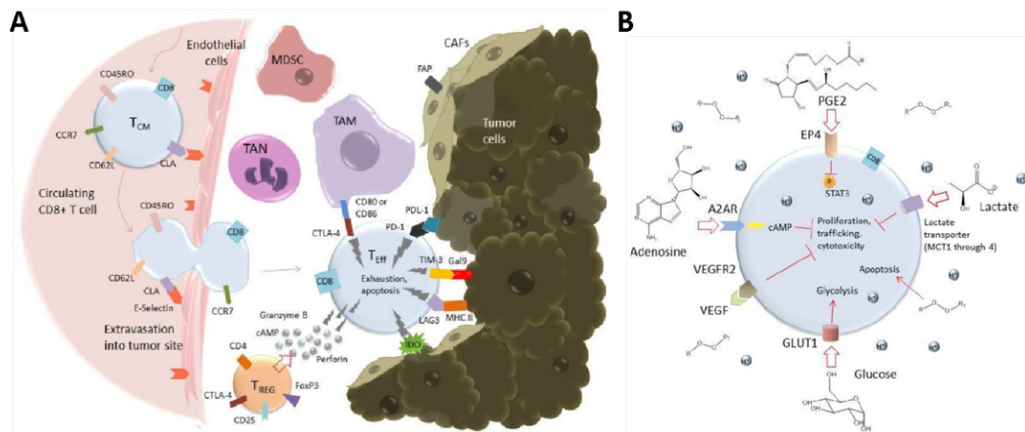


Figura 2. Representación esquemática de un microambiente tumoral inmunosupresor. (A) Se ilustran las restricciones físicas (como los CAF o matriz extracelular modificada por células endoteliales), celulares (MDSC, TAM y TAN) e inmunomoduladores (PD-L1, Gal9). **(B)** Elementos moleculares que limitan la función normal de las células T.

Resistencia intrínseca de las células tumorales al ataque de las células CAR-T

Estudios recientes sugieren que la activación de la apoptosis a través de la señalización de los receptores de muerte es responsable de una parte importante de la citotoxicidad de las células CAR-T *in vivo*. Las CT albergan una maquinaria apoptótica aberrante y pueden ser insensibles a la destrucción por las células CAR-T. Esta resistencia intrínseca de las CT a la destrucción por las CAR-T podría ser responsable de una parte significativa del fracaso del tratamiento. (11) (12) Las CT poseen múltiples estrategias para impedir la muerte celular y restaurar la homeostasis tras la degranulación de los linfocitos T, como: (i) una elevada expresión constitutiva de antioxidantes; (ii) un aumento de la autofagia; (iii) la activación de la reparación del ADN tras roturas de doble cadena; (iv) la presencia de inhibidores de proteasas endógenas (por ejemplo, serpinas), que impiden la actividad de las granzimas; y (v) la mutación, regulación a la baja o inhibición de proteínas de muerte celular, como las caspasas y las gasderminas (13).

Las CT también poseen multitud de estrategias para contrarrestar el ataque en la sinapsis inmunológica (SI) con las CAR-T, entre las que se incluyen: (i) externalización constitutiva mejorada de fosfatidilserina (PS), que impide la formación de poros por monómeros de perforina; (ii) reclutamiento de lisosomas dependiente del sensor de calcio de la sinaptotagmina VII (SYTVII) y liberación de catepsinas lisosomales en la SI, que degradan a las perforinas; (iii) el reclutamiento de proteínas del complejo de clasificación endosomal, que facilitan la eliminación del poro formado por la perforina; y (iv) la liberación de vesículas inhibitoras que contienen moléculas inmunopresoras como PD-L1. (13)

Estrategias para vencer resistencia intrínseca de las células tumorales al ataque de las células CAR-T

Muchos de los mecanismos de resistencia intrínseca de las CT al ataque de los linfocitos T están regulados por modificaciones de DNA e histonas. Mediante drogas epigenéticas es posible revertir estos cambios y sensibilizar a las CT para que puedan ser destruidas de modo más efectivo para las células CAR-T. Entre las drogas epigenéticas que se están desarrollando para el tratamiento del cáncer están: (i) CM-24 (SAHA) y CM-444, ambos inhibidores de las histonas deacetilasas (HDAC)-1, -2, -3 y -11 y (ii) CM-272 y CM-694 inhibidor de la histona eucromática-lisina N-metiltransferasa 2 (EHMT2, conocida también como G9a) y ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1 (DNMT1). Otras drogas, como CM-872 (Doxorubicina), no actúan a nivel epigenético sino inhibiendo la síntesis de ADN por inhibición de la topoisomerasa II al intercalarse entre sus bases y generar obstrucción estérica. Se ha visto que el tratamiento con una dosis subóptima de doxorubicina actúa sinérgicamente con las células CAR-T para eliminar eficazmente las CT de osteosarcoma (14).

EGFRvIII: ejemplo de antígeno específico de tumor diana de los CAR para tumor sólido

Entre los muchos Ags que se ha demostrado que se sobre-expresan en los tumores sólidos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tipo I representa uno de los Ag de superficie de mayor frecuencia. (9) El EGFR es una glicoproteína transmembrana de 170 kDa, que consta de un dominio de unión a ligando extracelular y una región intracelular con función tirosina-quinasa.

La activación a través de interacciones estimulantes con factores de crecimiento como EGF da como resultado la dimerización del receptor y la subsiguiente autofosforilación intracelular en los residuos de tirosina, lo que a su vez conduce a la activación de moléculas asociadas con la mitogénesis celular y la supervivencia. Dada la naturaleza oncogénica de estas vías en un primer momento se pensó que el impacto neoplásico de EGFR se debía solo a la amplificación de su gen correspondiente, sin embargo, hoy en día se conoce que muchos tumores, incluido el glioblastoma (GMB) también expresan reordenamientos aberrantes de dicho Ag con un claro papel oncogénico. (9)

La mutación de EGFR más común y mejor caracterizada se identificó por primera vez en tumores GBM humanos y se la conoce como la variante de clase III de EGFR (EGFRvIII). EGFRvIII es una forma constitutivamente activa e independiente del ligando del receptor de EGF de tipo salvaje (“*Wild Type*”; WT), cuya expresión ha demostrado tener efectos tumorigénicos, tanto aumentando la proliferación como inhibiendo la apoptosis. Estructuralmente, el EGFRvIII presenta es una delección en el marco de lectura de 801 pares de bases con respecto al receptor no mutado. Esta delección corresponde a los exones 2–7 del mRNA, cuya ausencia conduce a la traducción de un dominio extracelular truncado. (Fig. 3). La consecuencia de esta delección de los aminoácidos 6-273 genera la fusión de dos porciones distantes de la molécula, lo que a su vez crea una unión antigénica caracterizada por un nuevo residuo de glicina (LEEEKK⁵GN²⁷⁴YVVTDH), flanqueado por secuencias de aminoácidos que normalmente no son adyacentes en el receptor no mutado. (15)

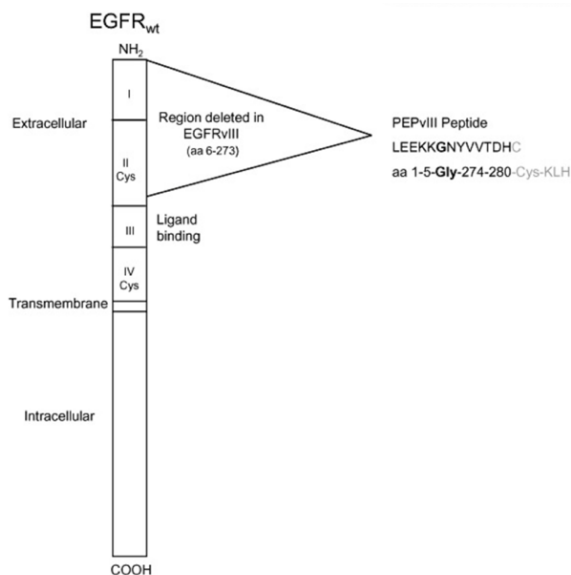


Figura 3: Diagrama esquemático de la proteína EGFR WT que muestra el área de delección dentro del marco que forma EGFRvIII. Durante la delección, los aminoácidos 6 y 273 se dividen formando una nueva glicina en la unión de los aminoácidos 5 y 274.(16)

Se ha demostrado que este epítipo específico del tumor está presente en la superficie de las CT, pero completamente ausente de cualquier tejido adulto normal (15). El gen *EGFRvIII* se sobre expresa en más del 90% de las muestras de GBM, lo que sugiere una actividad celular significativamente aumentada de este receptor en estos tumores. (15) (17) (18). En otros tumores, como el cáncer de mama (CAM), la señalización anormal de EGFRvIII también se considera una de las principales características de esta neoplasia, considerándose un importante factor oncogénico y una atractiva diana terapéutica. (19). En la actualidad ya existen CAR-T específicos del Ag EGFRvIII, como es el CAR-T 806-28zZ. (20).

Líneas tumorales modelo

Existen muchas líneas tumorales para la investigación del cáncer, las cuales son obtenidas de un animal modelo que recrea lo más parecido posible las condiciones de ese tumor en los pacientes. Para el estudio del GBM, las líneas tumorales más comúnmente empleadas son la GL261(21) y la CT2A. (22) ambas provenientes de ratones C57BL/6. Para el estudio del CAM las líneas tumorales más empleadas son las E0771 o la 4T1. La línea tumoral EO771 se deriva del CAM espontáneo de ratones C57BL/6. (23). La línea tumoral 4T1 proviene de ratones Balb/c (24)

1.1.Hipótesis

Muchos de los mecanismos de resistencia intrínseca de las CT al ataque de los linfocitos T son reversibles. Establecer una metodología que de modo simple y robusto permita medir la muerte de las CT por parte de las células CAR-T ayudaría al cribado de drogas que sensibilicen a las CT a la terapia CAR-T.

1.2.Objetivos

- 1- Poner a punto un método rápido, fácil y sencillo para medir la muerte de las CT por las células CAR-T, basado en la expresión de luciferasa como proteína discriminante entre las células dianas vivas y muertas.
- 2- Estudiar si el protocolo establecido nos permite identificar agentes y drogas capaces de revertir el fenotipo resistente de las CT al ataque por las células CAR-T.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diseño y puesta a punto de las líneas celulares

2.1.1. Líneas celulares

Se emplearon células Platinum-A (PLATA) y Platinum-E (PLATE) como células empaquetadoras de retrovirus anfotrópicos y ecotrópicos, respectivamente. Ambas células empaquetadoras derivan de la línea 293T y se cultivaron en medio PLATE-infección [DMEM-Glutamax (Gibco), FCS 10% (Sigma), HEPES, 100 U/mL penicilina (P) aminoácidos esenciales 1%, piruvato de sodio 1%, 100µg/mL estreptomicina (S), todos ellos obtenidos de Gibco] suplementado con puromicina (1µg/ml) y blasticidina (10µg/ml).

Las líneas tumorales empleadas fueron E0771, 4T1, GL261 y CT2A. Estas líneas habían sido modificadas en el laboratorio de la Dra. Hervas-Stubbs para expresar un homólogo murino EGFRvIII (m EGFRvIII). La secuencia del gen *mEgfrvIII* se creó a partir de la secuencia del gen *Egfr* murino (EMBL X78987) seleccionando los siguientes pares de bases del gen: 60-147, GT y 951-3737. Esto crea la secuencia LEEKKGNVVTDH, idéntica al EGFRvIII humano, respectando el resto de la secuencia de la proteína murina. Dado que el EGFRvIII señala de modo constitutivo, para evitar hacer más maligna a la CT, se truncó su parte citoplasmática (t). El gen *mEGFRvIII(t)* se clonó en el vector retroviral *pMSCV-IRES-Th1.1* que expresa también la proteína CD90.1 (codificada por Th1.1) que actúa como proteína reportera. A lo largo del trabajo se hace referencia a mEGFRvIII(t) como “vIII”. La caracterización de estas líneas en cuanto a los niveles de expresión de la proteína mEGFRvIII(t) se describe en la figura S1 (Apéndice). Todas las líneas tumorales se cultivaron en medio completo [RPMI-1640-glutamax, 10% suero fetal bovino, 100U/mL P, 100µg/mL S, 10mg/mL gentamicina, 1mM HEPES, 50mM 2-mercaptoetanol], en un incubador humidificado con 9% CO₂ a 37°C. Para despegarlas de la superficie de cultivo se empleó tripsina. Todas las líneas fueron certificadas como libres de mycoplasma, usando el kit Mycoalert Mycoplasma detection (Lonza).

2.1.2. Plásmidos y constructos

Para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) y la luciferasa (LUC) en las líneas tumorales se empleó el vector HSV1-tk-GFP/LUC (Fig.4). Este vector fue cedido por el Dr. Juri Gelovani (*MD Anderson Cancer Center, Houston, USA*) (25)

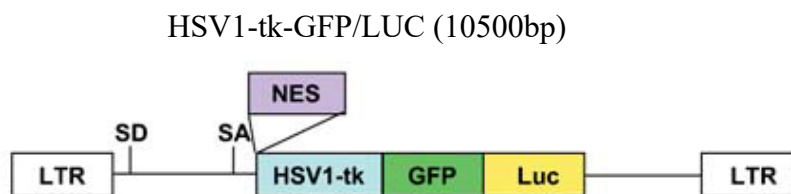


Figura 4: Estructura del plásmido retroviral HSV1-tk-GFP/LUC. El plásmido está flanqueado por secuencias largas LTR. Contiene una secuencia de señal de salida del núcleo (NES), la enzima timidin-quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSV1-tk) y la secuencia que codifica para la proteína GFP y LUC. Entre las regiones 5'LTR y HSV1-tk se encuentra la señal de empaquetamiento retroviral.

Se empleó un segundo vector denominado *MSCV-fLUC(mu)-IRES-Thy1.1* (Fig. 5), el cual expresa en su casete, de manera única los genes *Gfp* y *Luc*. Lo diseñamos a partir del plásmido *MSCV-Foxp3-IRES-Gfp*, donando por la Dra. Anjana Rao, el cual ya expresaba GFP, reemplazando el gen de *Foxp3* por el de *Luc* que fue sintetizado por GenScript.

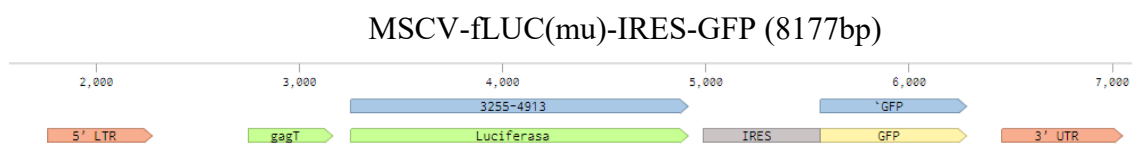


Figura 5: Diagrama de la estructura del plásmido retroviral *MSCV-fLUC(mu)-IRES-Thy1.1* diseñado en Benchling. El plásmido está flanqueado en sus extremos por las secuencias 5'LTR y 3'LTR. Posterior a la secuencia 5'LTR se encuentra la secuencia *gag* truncado, seguido por el gen *Luc* unido por un IRES al gen *Gfp* hasta el extremo 3'LTR.

2.1.3. Producción de retrovirus anfotrópicos e infección de las células tumorales

Se utilizaron células Plat-A para producir retrovirus anfotrópicos. Se incubaron 8×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos, en 2mL/pocillo de medio de infección. Al día siguiente, se añadió 500uL de una mezcla de los plásmidos HSV1-tk-GFP/LUC o *MSCV-fLUC(mu)-IRES-Thy1.1* (2µg/pocillo), el plásmido ayudante pMDG (1µg/pocillo) y lipofectamina (10uL/pocillo) en medio OPTIMEM sin antibiótico. Veinticuatro horas después de la transfección, se retiró el sobrenadante y se añadió medio PLAT-E con antibiótico, pero sin drogas de selección. Se recogió el sobrenadante 48 y 72 horas después de la transfección. Para transducir las CT, se añadió el sobrenadante de las 48h suplementado con polibreno (10 ug/mL). Se repitió la infección al día siguiente con el sobrenadante de las 72h.

2.2. Diseño y preparación de las células CAR-T

2.2.1. Plásmidos y constructos

Los CAR anti-CD19 humano y anti-EGFRvIII de ratón utilizados en este estudio fueron sintetizados previamente por el equipo de la Dra. Hervás-Stubbs. Brevemente, las secuencias quiméricas que codifican el scFv, la región transmembrana y el dominio 4-1BB junto con el dominio de señalización coestimulador CD3ζ fueron sintetizadas por GeneScript. Se empleó un constructo bicistrónico que co-expresa GFP (proteína reportera) empleado para medir la eficacia de la transducción retroviral. Tras la traducción ambas proteínas son separadas por acción del péptido autocatalítico 2A (P2A).

Las secuencias con codones optimizados se insertaron en el vector retroviral pRUBIC bajo el control del promotor de la ubiquitina.

En el trabajo desarrollado se emplearon dos CARs diferentes, CAR-CD19 (pRUBI-(h)CD19bbz) que reconoce a CD19 humano, empleado como control negativo, y el CAR-806 (pRUBI-ScFv806) con el ScFv del hibridoma 806 que reconoce el epítipo LEEKKGNYVVTDH de EGFRvIII.

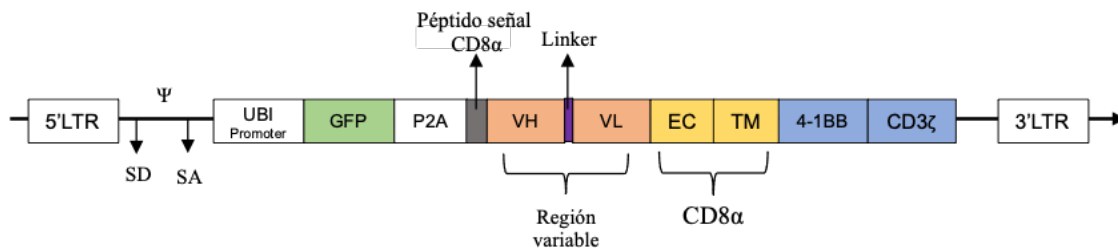


Figura 6: Ilustración del plásmido retroviral que codifica el gen CAR-CD19. El gen está flanqueado por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) utilizadas para insertar la secuencia en el genoma huésped. El vector contiene señales de empaquetamiento (ψ), la secuencia peptídica 2A (P2A), las regiones variables (VH y VL) del scFV, el dominio extracelular (EC), el dominio transmembrana (TM) y los dos dominios de señalización intracelular (SD) 4-1BB y CD3 ζ , respectivamente.

2.2.2. Producción de retrovirus ecotrópicos

Se utilizaron células Plat-E para producir retrovirus ecotrópicos. Todas las condiciones son idénticas a las antes descritas en la producción de retrovirus anfotrópicos. Excepto porque se emplearon plásmidos retrovirales diferentes y en lugar de emplear pMDG se empleó PCL-Eco.

2.2.3. Procesamiento del bazo

Se extrajeron bazos de ratones C57BL6. Tras la disgregación del órgano, se lisaron los eritrocitos con tampón amonio-cloruro-potasio (ACK) [0,15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA, pH 7,2]. Las células se resuspendieron en *buffer* Automacs (BA) [PBS 500mL, 2,5mL FCS, 2,5mL EDTA 0,5M, 5mL P/S] y se contaron usando el método de recuento de la cámara de Neubauer.

2.2.4. Aislamiento de linfocitos T CD8+

Se utilizó el método *EasySep* (STEMCELL) para aislar el subconjunto CD8+ por selección negativa. Se añadieron 50uL de Suero de Rata/mL de muestra para bloquear interacciones inespecíficas. Posteriormente, se añadieron 50uL de *Isolation Cocktail*/mL para promover la unión de poblaciones celulares no deseadas con anticuerpos

monoclonales (mAbs) unidos a microesferas de biotina. Tras 10 minutos a RT, se añadieron 125uL de *RapidSpheres*/mL de muestra, perlas magnéticas unidas a estreptavidina. 5 minutos después a RT, se utilizó el imán *EasySep* para separar la fracción positiva (retenida por la fuerza magnética) mientras que la fracción negativa (CD8+) se decantó en un tubo nuevo.

2.2.5. Activación de linfocitos T CD8+

La infección por retrovirus requiere accesibilidad a la cromatina de las células diana, por lo que deben estar dividiéndose. Por lo tanto, la activación es necesaria en este proceso. Los linfocitos se expusieron a dos mAbs, α -CD3 (Clon 145-2C11) (pegado al fondo del pocillo) y a α -CD28 (Clon 37. 51) (soluble). Para fijar el mAbs α -CD3 al pocillo, se necesitó una solución de 300uL/pocillo de PBS con α -CD3 de ratón (2 μ g/mL). Este se dejó incubar de 2 horas a 37°C (o toda la noche a 4°C). Después, se limpiaron los pocillos con PBS antes de añadir 10⁶ células T CD8+ por pocillo (1mL/pocillo), en medio completo con IL-2 (50U/mL) y α -CD28 (1 μ g/mL), incubadas durante 48 horas a 37°C 9% CO₂.

2.2.6. Infección de linfocitos T CD8+

Cuarenta y ocho horas después de la activación, la población CD8+ se infectó mediante el método de espinoculación con retrovirus. Para ello, se incubaron 10⁶ células/pocillo en 1mL de sobrenadante de células Plat-E, que contienen: los retrovirus, 10 μ g/mL de sulfato de protamina e IL-2 (50U/mL). Posteriormente, se realizó una centrifugación del pocillo sin aceleración ni freno (2000 g, 90 min a 32°C). Después, se añadió 1mL/pocillo de medio de ratón suplementado con IL-2 (50U/ml) y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se realizó el mismo procedimiento. La eficacia de la infección se comprobó a las 48 y 120 horas después de la primera infección, midiendo la expresión de GFP mediante un citómetro de flujo FACS CANTO (BD Biosciences).

2.3. Ensayos funcionales

Para los experimentos de citotoxicidad se emplearon 4 líneas tumorales (E0771, 4T1, GL261y CT2A) que expresaban o no el AD del CAR-T [mEGFRvIII(t)] y la proteína LUC. Las CT que no expresaban el AD actuaban como control negativo.

2.3.1. Cultivo

Se cultivaron (placa de 96 pocillos) 5×10^4 CT/pocillo y diferentes cantidades de célula CAR-T, de modo que se establecieron distintos ratios CT:CAR-T. Las células se cultivaron durante 4 y 24h y se analizó la citotoxicidad y la producción de IFN γ . Para estudiar los efectos del IFN γ y de las diferentes drogas, se cultivaron las CT con IFN γ durante 48h a 500U/ml, o con los HITS o DMSO (disolvente empleado con los HITS) durante 24h a las dosis indicadas en placa de 6 pocillos. Tras lavar, se cultivaron con las células CAR-T como se detalló antes. En los estudios en los que se titularon las drogas para encontrar dosis no citotóxica, tras el tratamiento con las drogas se midió la citotoxicidad sin proceder al cultivo con las células CAR-T. Se emplearon cinco HITS [CM-24 (SAHA), CM-444, CM-272, CM-694 y CM-872 (Doxorubicina)] que fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Antonio Pineda 2.08-CIMA).

2.3.2. Ensayo de citotoxicidad

Transcurrido el tiempo, se centrifugó la placa (2500rpm, 2min) se retiraron 120ul de sobrenadante para medir en ellos IFN γ por ELISA. El resto de volumen fue decantado. Los pocillos se lavaron con 100ul/well de PBS y se volvió a centrifugar (2500rpm, 2min). Se añadieron 30ul/well de “*Passive Buffer Lysis 5X*” (Promega, Madison USA), diluido con agua inyectable Brawn, hasta una concentración 1X. Se centrifugó la placa y se pasaron 20ul del sobrenadante a una P96W blanca. Posteriormente se añadieron 50ul/well de “Luciferase Assay Substrate” (Promega, Madison, USA) previamente diluido con “Luciferase Assay Buffer” (Promega, Madison, USA). Se midió la luminiscencia empleando el GloMax (Promega, 4.06-CIMA). El porcentaje de citotoxicidad se pudo conocer tras analizar la luminiscencia empleando la siguiente formula %Cit. = $[1 - (\text{RLU CAR-806} / \text{RLU CAR-CD19})] \times 100$.

2.3.3. ELISA de IFN γ

La activación de la población CAR-T se evaluó midiendo el IFN γ producido por las células CAR-T, tras el cultivo con las CT, mediante ELISA (BDBiosciences). Para ello, se pegó el Ab de captura anti-IFN γ en placas MaxiSorp (Nunc) a la dilución recomendada por el fabricante y usando el buffer de “Coating” carbonato de sodio (0,1M, Ph=9.5). Se dejó overnight a 4°C. Al día siguiente se lavaron las placas por inmersión en “Washing Buffer” (PBS 1x Ph=7,2 al 0,1% de Tween-20). Tras los lavados se añadió la solución de bloqueo (PBS al 10% de FCS), y se dejó incubar 1h a temperatura ambiente. A

continuación, se añadieron las muestras, el blanco (medio de ratón) y el estándar mIFN γ cuya concentración máxima es de 2.000pg/ml. Se realizaron diluciones $\frac{1}{2}$ del estándar empleando medio completo. Se dejó incubar toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo se lavó por inmersión en *Washing buffer*, se añadió 50ul/well de la solución de detección. (PBS al 10% de FCS + Ac de detección + streptavidina) y se dejó incubando 1h a RT.

Se lavó con el *Washing buffer* y se añadieron 100ul/well de la solución sustrato (TMB substrate for ELISA, Thermo Fisger Kit) se dejó 10 minutos a RT y se paró la reacción añadiendo 50ul/well de H₂SO₄ 2N. Por último, se midió la luz emitida por la muestra en el espectrofotómetro tras ser estimulada a una longitud de onda da 450 nm. Los resultados se estudiaron teniendo en cuenta el blanco, el volumen por pocillo, el factor de dilución y las concentraciones del estándar.

2.4. Citometría de flujo

Los anticuerpos utilizados en el estudio de la transfección celular se detallan en la tabla 1 (Apéndice). Se utilizó FACS Canto II (V96300834, BD Biosciences) para analizar las poblaciones celulares. Los análisis posteriores se realizaron con el programa FlowJo (v. X 10.0.7.r2).

2.5. Estadística empleada

Para el análisis estadístico, los experimentos in vitro se realizarán por triplicado. Se empleó la prueba de ANOVA unidireccional para comparar varios grupos experimentales. Los resultados se muestran en gráficos donde se indica con ninguna, una, do o tres estrellas si la diferencia no es significativa lo es en menor medida o es muy significativa respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Modificación genética de las líneas tumorales para expresar GFP/LUC

Con objeto de medir de modo rápido y específico la muerte de las CT por parte de las células CAR-T, se escogió un método basado en la actividad de la luciferasa (LUC) cuyo fundamento se explica en la figura S2 (Apéndice). El ensayo requiere la expresión de LUC en la CT quedando retenida en las células vivas, pero liberándose en las muertas, funcionando de este modo como proteína discriminante entre las células dianas vivas y muertas. Para ello, se modificaron células de CAM (4T1 y EO771) y GBM (GL261 y CT2A) de forma estable con vectores retrovirales que expresaban LUC. En un primer abordaje se hicieron retrovirus con el vector retroviral “triple modality” (RV-TM), que contenía el constructo *Hsv1-tk-Gfp/Luc* y expresaba LUC como una proteína de fusión junto a HSV1-TK y GFP. El *Gfp* se usó como gen reportero. Mediante los niveles de expresión de GFP en las CT podemos conocer el nivel de expresión de todo el constructor (y por tanto de LUC) es decir, el porcentaje de CT transducidas.

El procedimiento que se llevó fue el siguiente (Fig. 8A) Se partió de un cultivo de las 4 CTs de interés que expresaban o no el AD del CAR [EGFRvIII(t)]. Las CTs se infectaron a día 1 y día 2 con RV-TM. Como control negativo, de cada línea se dejaron células sin transducir (NT). Posteriormente se analizaron por FACS, entre el día 2-5 de la primera infección, y a la semana siguiente se separaron las células transducidas en caso de que la infección fuese <90%.

Como se observa (Fig. 8), mientras que el porcentaje de células infectadas (medido como GFP⁺) en las líneas de GBM fue de entre 40-65%, en las de CAM fue bastante menor, entre 8-15 %. A continuación, las células transducidas de las líneas de GBM fueron separadas por FACS, quedando finalmente enriquecidas en células GFP⁺ entre un 72-78% en las líneas derivadas de GL261, y en un 98% en las derivadas de CT2A. Debido al bajo nivel de infección de las líneas derivadas de EO771 y 4T1 con el RV-TM no procedimos a su enriquecimiento por FACS y decidimos usar otro abordaje para su modificación genética.

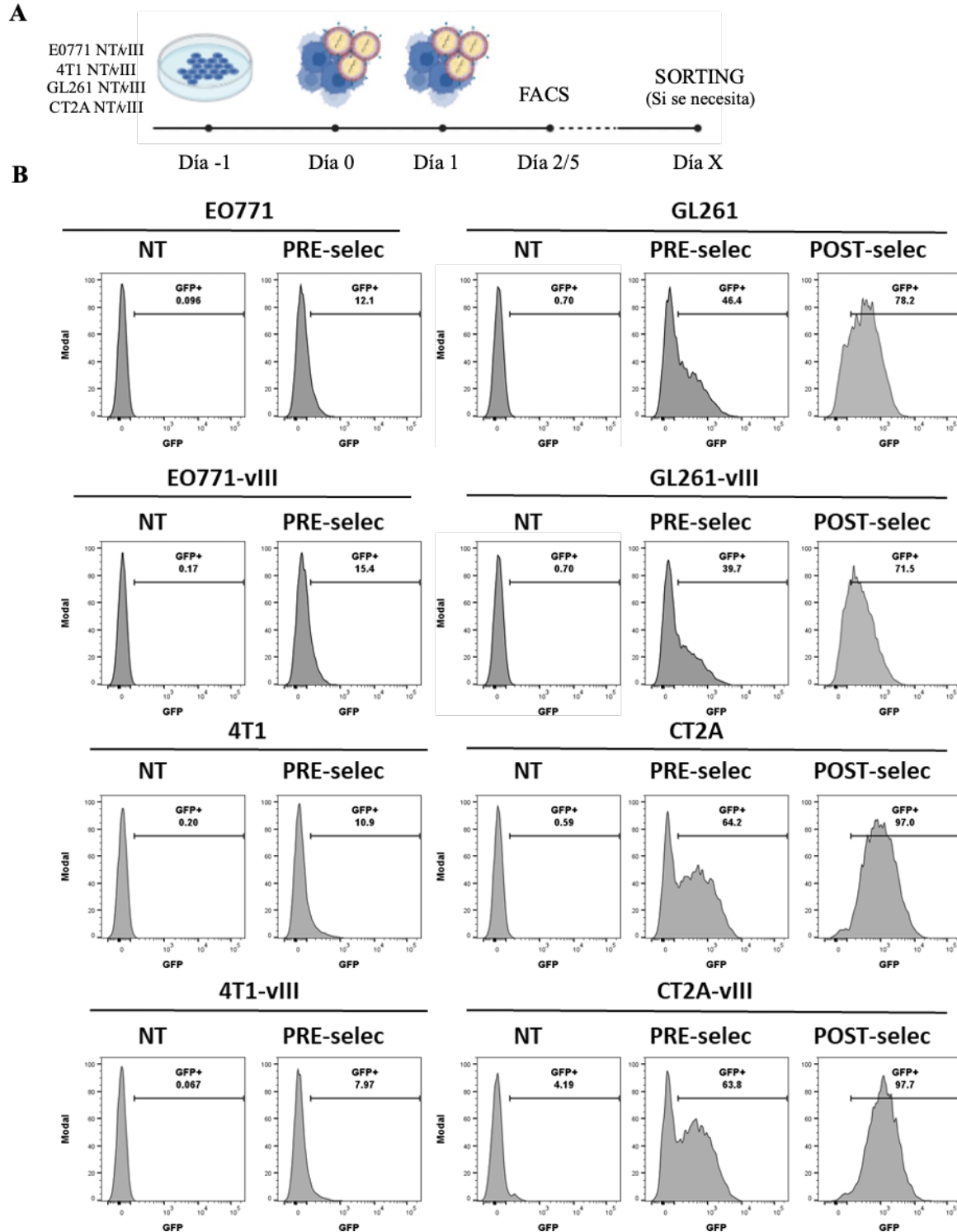


Figura 8: Nivel de expresión de GFP en las CT estudiadas. (A) Procedimiento seguido en la infección de las líneas tumorales, (B) Histogramas que muestran el porcentaje de expresión de GFP en cada línea tumoral en diferentes condiciones, no transfretada (NT), infectada y pre- y post-selección (selec) por FACS. *El porcentaje de infección de las líneas E0771 y 4T1 fue tan bajo que no se seleccionaron por FACS. vIII se usa como diminutivo de EGFRvIII.

Se sabe que cuando el tamaño del inserto es muy grande los títulos de los RV son menores. Pensamos que esto es lo que podría estar pasando con el vector “TM” y que de modo particular afectaba a las líneas de CAM. Por ello, decidimos hacer un nuevo vector, pero expresando solo Luc y GFP. Para ello, se clonó el gen *Luc* en el vector MSCV-IRES-GFP generando de este modo el vector *MSCV-fLuc(mu)-IRES-Gfp*, que denominaremos “dual modality” (DM), reduciéndose de este modo el tamaño del inserto.

El procedimiento seguido para infectar las líneas de CAM con los RV generados con el vector DM fue el mismo al mencionado en el primer abordaje (Fig. 8A). El nivel de transducción de ambas líneas celulares fue mejor que con los RV-TM. En el caso de las líneas EO771 y EO771-EGFRvIII(t) llegó a ser del 99%, por lo que no se requirió seleccionar las células transducidas. En el caso de las 4T1-NT y 4T1-EGFRvIII(t), el nivel de transducción fue 69 y 82%, respectivamente, y para unificarlas se procedió a la selección por FACS de las células transducidas, alcanzando finalmente un nivel de expresión de transducción del 93%.

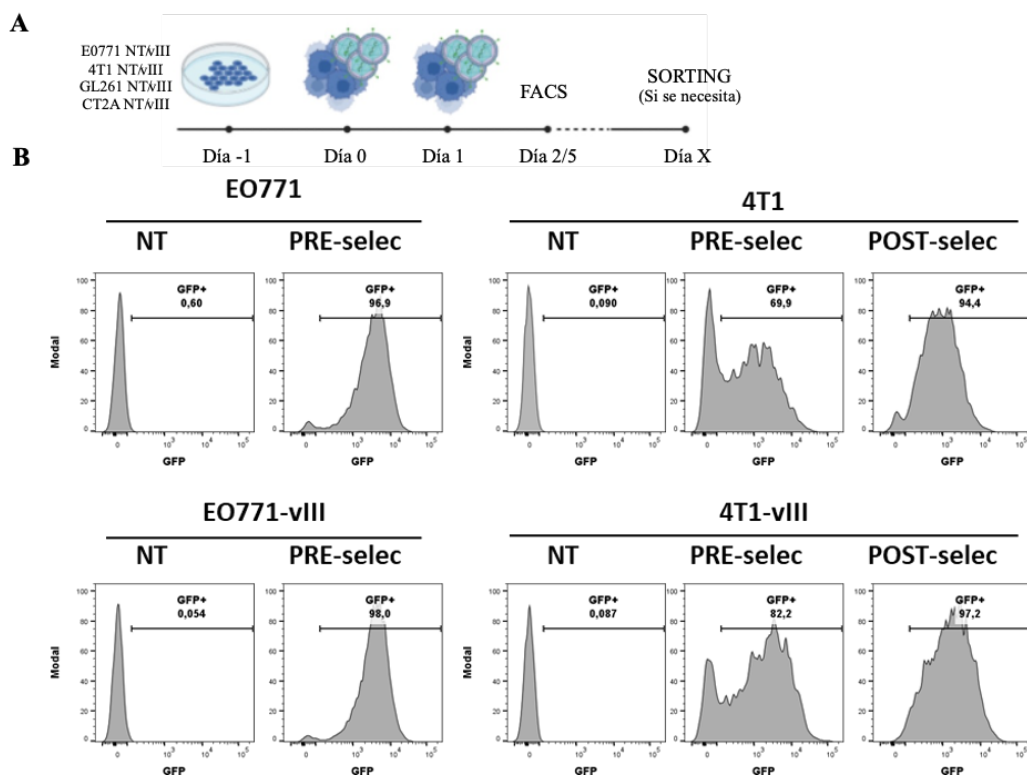


Figura 9: Infección de las líneas tumorales EO771 y 4T1 para expresar GFP/LUC, segundo abordaje. (A) Procedimiento seguido en la infección de las líneas tumorales (B) Histogramas que muestran el porcentaje de expresión de GFP en cada línea tumoral en diferentes condiciones, no transfectada, infectada y pre-selección y post-selección. vIII (EGFRvIII).

A continuación, medimos los niveles de expresión de LUC. Para ellos se sembraron las CT en placa de cultivo (100.000 células/pocillo) y al día siguiente se midió la expresión de LUC como se detalla en Material y Métodos. En todas las células se detectó un buen nivel de LUC (medido como señal luminiscente) que era claramente diferente de la luminiscencia de base.

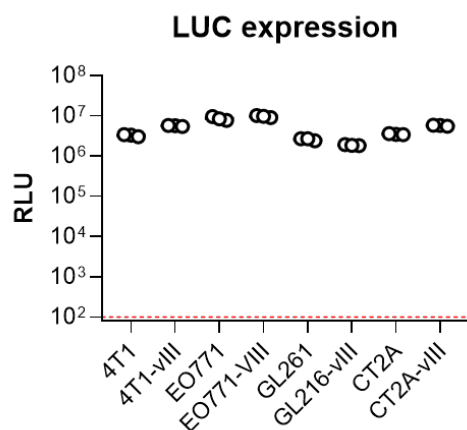


Figura 10. Expresión de LUC por las CT modificadas para expresar LUC. RLU (*relative light unit*). La línea vertical en rojo indica la luminiscencia de fondo. *Todas las líneas expresan las proteínas GFP/LUC. *vIII* (*EGFRvIII*).

3.2. Ensayos de citotoxicidad y estudio de la activación CAR-T para evaluar las células CAR-T (24h/4h)

Se modificaron genéticamente LT de ratón con RV para que expresaran el CAR deseado: CAR-806, específico de EGFRvIII humano que reconoce también al homólogo EGFRvIII murino, y CAR-CD19 que reconoce CD19 humano, como control negativo. El proceso de infección (Fig. 11A) que se llevó a cabo para el CAR-CD19 y para el CAR806 fue el mismo. Tras su infección se estudiaron los niveles de transducción (como células GFP⁺) para cada población de células CAR-T mediante FACS (Fig. 11B). La infección con ambos CAR fue muy buena alcanzándose niveles > 88% tras la segunda infección. Con objeto de saber si las CT que expresaban mEGFRvIII serían válidas para un ensayo de citotoxicidad, cultivamos las células CAR-806 durante 24h con las CT LUC⁺ que expresaban el AD del CAR. Como control negativo, se usaron CT LUC⁺ que no expresaban el AD, así como las células CAR-T que expresaban un CAR no específico del AD (CAR-CD19). Tras el cocultivo se calculó el porcentaje de citotoxicidad como se detalla en Material y Métodos. El porcentaje de citotoxicidad del CAR-806 frente a las CT que expresan el AD fue muy alto, incluso a ratios 1 célula efectora: 4 CT (E:T = 1:4) (Fig. 11C).

No se observó citotoxicidad frente a la población tumoral parental ni tampoco con el CAR-CD19 frente a ninguna de las líneas CT que expresaban el AD. También se analizó la activación del CAR mediante la medición del IFN γ (Fig. 11D). liberado al medio de cultivo (ELISA), observándose de nuevo una alta producción de IFN γ incluso a E:T = 1:4. Solo se observó producción de IFN γ por parte de la población CAR-806 cultivada con la CT que expresaban el AD.

Ambos resultados demuestran que el CAR-806 claramente se activa, reconoce y mata las CT que expresan el AD de manera discriminada frente a las CT que no lo expresan y a diferencia del CAR-CD19 que no se activan y no generan la muerte de ninguna CT. Una vez comprobado el reconocimiento específico del CAR-T por su AD, no se incluyeron las CT parentales en los siguientes estudios.

Para poder estudiar la eficacia de las drogas se requiere trabajar con unos márgenes de citotoxicidad que permitan observar aumento o disminución de la misma por efecto de la droga. Por ello, se decidió acortar el tiempo de cultivo de 24 a 4 horas.

Como se observa en la figura 10D, tiempos de cultivo más cortos permitió ver un efecto dosis/respuestas con unos porcentajes de citotoxicidad de entre 20-50% en las líneas de CAM y de entre 20-75% en las líneas de GBM. A ratios E:T= 1:1 las CT de GBM son lisadas con mayor eficacia que las CT de CAM. El acortamiento del tiempo de cultivo también disminuyó los niveles de IFN γ detectados, observándose de nuevo un efecto dosis/respuesta.

Al igual que ocurrió con la citotoxicidad, la población CAR-806 secretó menos IFN γ tras cultivarse con las líneas de CAM que con las de GBM, lo que indica que el CAR-806 se activó mejor cuando se enfrentó a las CT de GBM. La menor exposición en membrana del Ag mEGFRvIII en las CT de CAM que de GBM (Fig. S1, Apéndice), explicaría estos resultados. El CAR-CD19 no fue capaz de producir citotoxicidad ni secretar IFN γ cuando se enfrentó a las líneas tumorales.

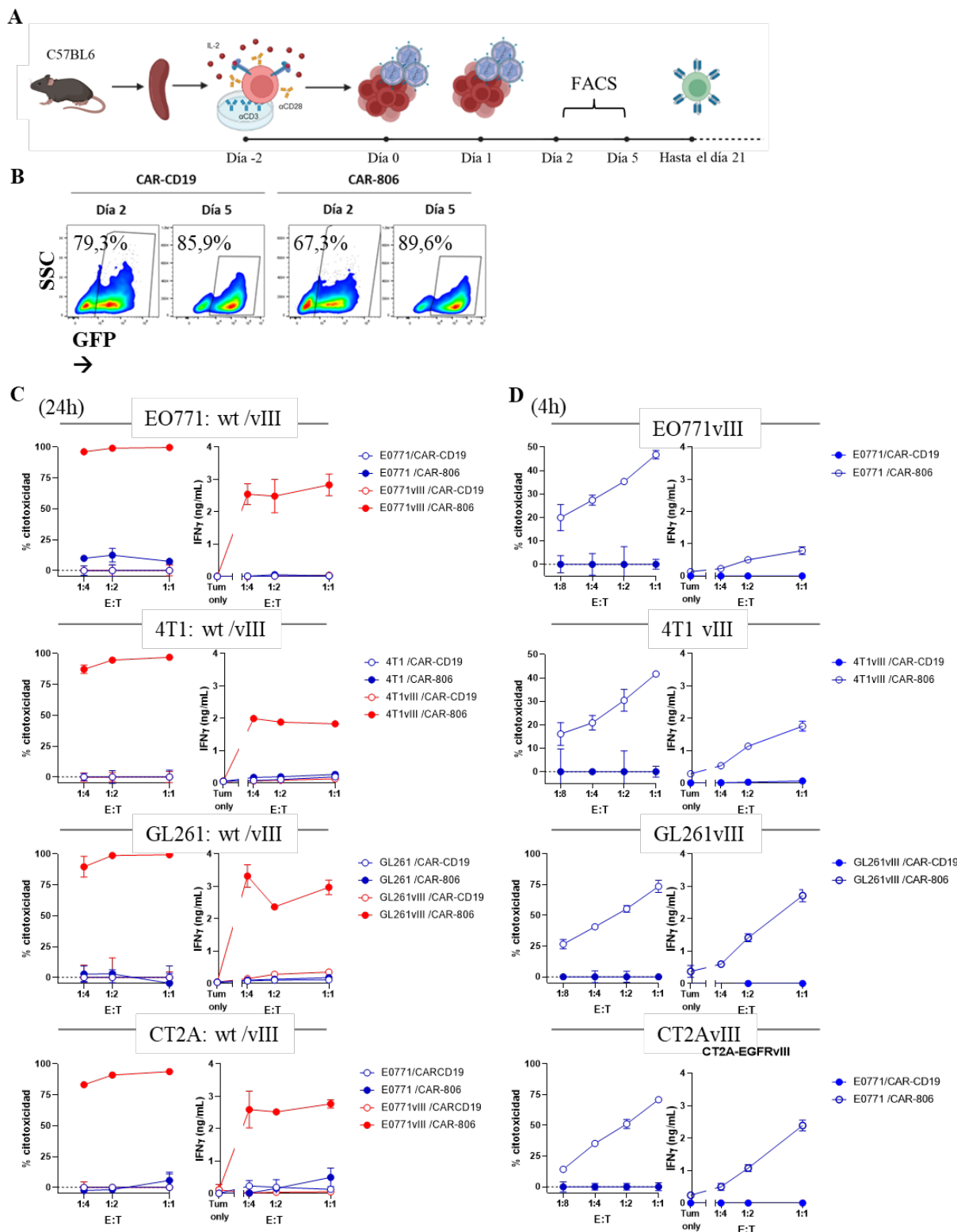


Figura 11: Producción de CAR, análisis de muerte tumoral y análisis de activación del CAR. (A) Esquema de trabajo seguido para la producción del CAR-806 y CAR-CD19. (B) Pseudoplots que muestra el porcentaje de población CAR que expresa GFP (proteína reportera de la expresión del CAR). (C y D) Análisis de la muerte tumoral (reflejado como % citotoxicidad), y estudio de la activación de las células CAR (reflejado como niveles de IFN γ en el sobrenadante de cultivo) tras el cocultivo [24h (C) o 4h (D)] de las CT y las células CAR-806 y CAR-CD19. vIII (EGFRvIII). Todas las CT expresan LUC.

3.3.Efecto del IFN γ o HITS sobre la citotoxicidad y la producción de IFN γ por el CAR-T

Hay datos en la literatura que indican que el IFN γ podría sensibilizar o desensibilizar a las CT al ataque por los linfocitos T (26). Para conocer cómo afectaría el IFN γ a la lisis de las CT por las células CAR-T, pretratamos las CT con IFN γ durante 48h y, tras lavar, se enfrentaron a las células CAR-T y se analizó su lisis y la producción de IFN γ (Fig. 12A). Curiosamente, mientras que la lisis de la línea E0771 por las células CAR-806 se vio aumentada por el pretratamiento con IFN γ , lo contrario ocurrió con las líneas 4T1 y GL261 (Fig. 12B). No se observaron efectos claros sobre las células CT2A, aunque en general se puede decir que el pretratamiento con IFN γ no afectó a su capacidad de ser lisada por las células CAR-806. Por el contrario, los niveles de IFN γ producido por las células CAR-806 no fueron significativamente diferentes, por lo que el proceso de activación del CAR-T no se vio afectado.

Para el estudio del efecto de las drogas (HITS) escogidas sobre la capacidad de la CT de ser lisadas por las células CAR-T, nos concentramos en las células CAM (E0771 y 4T1). Como las drogas podrían tener un efecto tóxico sobre las CT, se hizo una curva de titulación cultivando las CT que expresaban LUC con diluciones seriadas de cada HIT y de este modo encontrar una concentración de HIT que no fuese tóxico (Fig. 12C). Como control, se hizo soluciones seriadas del disolvente en el que estaban disueltas las drogas (DMSO).

A las 24h del cultivo se evaluó la toxicidad de la droga midiendo la luminiscencia. Para la línea E0771 se observó que los HITS más citotóxicos fueron CM-24, CM-444 y CM-872. Para la línea 4T1 se observó como los HITS CM-24, CM-444 a concentraciones altas tienen un papel citotóxico, sin embargo, a concentraciones más bajas potencian el crecimiento de la CT (inferido por el aumento de la señal de luminiscencia). Los HITS CM-272 y CM-694 presentaron una actividad similar al DMSO. Lamentablemente, por falta de tiempo y por no disponer de suficiente número de células, solo se pudieron continuar estudiando dos HITS, el CM-272 y el CM-694. Se escogió una dosis que no tuviera efecto tóxico sobre las CT, que fue de 15 μ M para CM-272 y CM-694, en el caso de las células E0771, y de 5 μ M para CM-272 y CM-694, en el caso de las 4T1. El procedimiento seguido para estudiar la citotoxicidad fue similar al antes mencionado para el IFN γ pero el pretratamiento con los HITS se hizo solo durante 24h (Fig. 12D). Como se observa en la figura 12E, ambas drogas aumentaron la sensibilidad de las células 4T1

a ser lisada por el CAR-806, mientras que solo CM-694 lo hizo en el caso de las células EO771. Curiosamente, los niveles de IFN γ secretados por las células CAR-806 (Fig. 12G) y por tanto su activación, fueron significativamente menores tras el pretratamiento tumoral con CM-694. La mayor actividad citotóxica de las células CAR-T frente a las líneas tumorales cuando estas habían sido pre-tratadas con CM-694 habría contribuido a bajar la carga tumoral y por tanto el estímulo necesario para que las células CAR produzcan IFN γ . En estos estudios también se interrogó la citotoxicidad y la secreción de IFN γ de las células CAR-CD19 frente a ambas líneas tumorales y no se observó efecto.

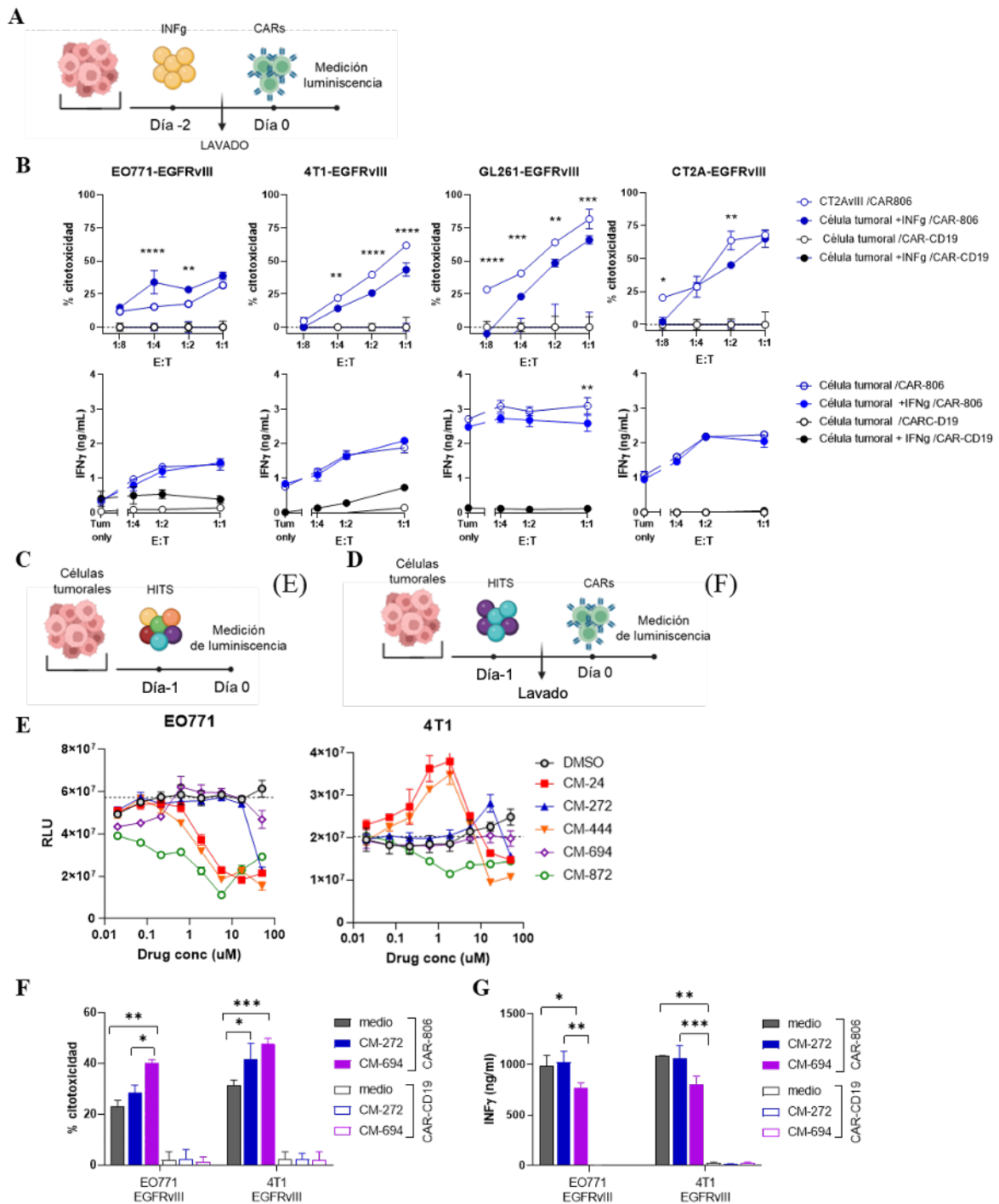


Figura 12: Estudio de diferentes drogas (IFN γ / HITS) sobre la muerte tumoral y la activación del CAR806. (A) Esquema seguido en el cocultivo de las CT (mEGFRvIII⁺) junto con IFN γ + CAR-806/CAR-CD19 (control). (B) Análisis de la muerte celular de las diferentes líneas celulares estudiadas (fila superior) y estudio de la activación del CAR-806 y CAR-CD19 (fila inferior). (C) Esquema de trabajo para el estudio de las curvas de titulación de los HITS. (D) Esquema de trabajo del cocultivo con los HITS seleccionados. (E) Análisis de la curva de titulación en las líneas de CAM. Se estudio la muerte celular producida únicamente por la droga, posteriormente se estudiaron los niveles de luminiscencia (RLU) frente la concentración de droga. (F) Análisis de la muerte celular en las líneas de CAM cultivadas con los HITS seleccionados. (G) Estudio de la activación del CAR-806 y CAR-CD19 tras el cocultivo de las líneas tumorales de CAM cultivadas en presencia de drogas. (C-G) Las CT empleadas expresan mEGFRvIII.

4. DISCUSIÓN

El ensayo de citotoxicidad basado en la medición de LUC es un método simple, preciso, sensible y robusto que permite medir de modo rápido y específico la muerte de las células diana facilitando el cribado de drogas. Este ensayo aprovecha las propiedades de LUC, una enzima muy estable que oxida el pigmento luciferina con gasto de ATP y produciendo luz (Fig. S1, Apéndice). El ensayo implica la expresión de LUC en las células diana de manera que en las células que están vivas LUC se retiene activa en el citoplasma, mientras que en las que muere se libera al medio. En este estudio, utilizamos este método para estudiar la lisis de las CT por parte de las células CAR-T. Para ello, modificamos de modo estable CT murinas, que expresaban o no el AD del CAR (el homólogo murino de EGFRvIII), con retrovirus que expresaban LUC. Demostramos que este ensayo es altamente sensible, siendo necesario acortar el tiempo de cocultivo de las células CAR-T con las CT de 24 a 4h para ver efecto dosis (ratio E:T) / respuesta (citotoxicidad). Validamos aún más este ensayo al demostrar su capacidad para detectar la sensibilización (o de-sensibilización) de la CT a la lisis por parte de las células CAR-T por el efecto de agentes inmunológicos (IFN γ), drogas epigenéticas o quimioterapéuticos.

En cuanto a la modificación de las CT para la expresión de LUC, en un primer abordaje se usaron RV producidos con el vector “TM”. En general, la infección con estos RV fue muy deficitaria, especialmente en las células de CAM. Se desconoce los motivos por lo que las células de CAM se infectaron peor que las de GBM, pero podría estar relacionado con la mayor tasa proliferativa de las células CAM, que favorecería que llegaran al estado de confluencia antes que las de GBM. Se sabe que un alto porcentaje de confluencia suele estar asociado a una menor transfección y transducción de las células adherentes, aunque las causas de esta asociación no son conocidas. Para conseguir niveles óptimos de

transducción en las CT de CAM fue necesario construir un nuevo vector retroviral (“DM”), que expresaba LUC y GFP, más pequeño que el vector TM. Constructos pequeños facilitan que el RNA de los RV se empaqueten mejor, produciendo títulos de RV más altos y, consecuentemente, mejores niveles de infección.

Utilizando el método de LUC hemos estudiado cómo el IFN γ afecta la capacidad de las CT a ser lisada por las células CAR-T. Curiosamente, mientras que el pretratamiento de las CT con IFN γ sensibiliza a la línea EO771 a la lisis por las células CAR-T, lo contrario ocurre con las líneas 4T1 y GL261, y no afecta seriamente a las células CT2A. Estos resultados dispares podrían deberse al efecto dual del IFN γ sobre las propias CT. Por un lado, el IFN γ tiene propiedades citostáticas, pro-apoptóticas y antiproliferativas y estimula en las CT la expresión de moléculas de la maquinaria de procesamiento y presentación de Ags y, por tanto, el reconocimiento por los linfocitos T, así como la síntesis de integrinas, que favorecen la sinapsis inmunológica entre la CT y las células T (26). Sin embargo, por otro lado, el IFN γ también inhibe la acción efectora y citotóxica de las células T al inducir en las CT la expresión de genes de resistencia, como PD-L1 (26). Curiosamente, el pretratamiento de las CT con IFN γ no afectó en ningún caso a la activación de los CAR-T (medido por IFN γ). Esto sugiere que la sensibilización, o de-sensibilización, mediada por el IFN γ de las CT a la lisis por las células CAR-T se lleva a cabo por mecanismos que no afectan a la activación de las células CAR-T. Estos mecanismos podrían ser: (i) en el caso de la sensibilización, por aumento de señales de muerte, o potenciando la cascada de apoptosis, y (ii) en el caso de la de-sensibilización, por favorecer mecanismos de resistencia a la lisis, como resistencia a la perforina. (27) Los diferentes efectos del IFN γ sobre las CT estudiadas merecen un estudio más a fondo que será objeto de futuros trabajos del grupo.

Muchos de los mecanismos de resistencia intrínseca de las CT al ataque de los linfocitos T están regulados por modificaciones de DNA e histonas. Según esto, es esperable que mediante el uso de drogas epigenéticas y quimioterapéuticos sea posible revertir el fenotipo resistente. La mayoría de estos agentes tienen un efecto directo citotóxico sobre las CT. Para estudiar su capacidad sensibilizadora a la muerte por CAR-T primero hicimos una titulación de las diferentes drogas estudiadas en las células CAM (EO771 y 4T1). El ensayo de citotoxicidad basado en la medición de LUC nos sirvió para identificar

la dosis máxima de cada una de las drogas estudiadas a la cual la droga no tenía efecto tóxico directo. Esta dosis variaba para cada tipo de droga y CT, siendo la línea EO771 más sensible que la 4T1. Una vez identificada esta dosis, se pre-trataron las CT con ellas y se enfrentaron a las células CAR-T. Por falta de tiempo finalmente solo pudimos estudiar dos drogas, CM-272 y CM-694, que son inhibidoras de la metilasa DNMT1 y G9a, implicadas en la metilación de mantenimiento del ADN (28) (29). En el caso de las células 4T1, ambas drogas aumentaron su sensibilidad a ser lisada por las células CAR-806, siendo CM-694 la más efectiva, mientras que solo CM-694 sensibilizó a las células EO771. Curiosamente, en ambas líneas los niveles de IFN γ secretados por las células CAR-806 fueron significativamente menores tras el pretratamiento tumoral con CM-694. La muerte más rápida y efectiva de las CT por la acción de las CAR-T habría contribuido a bajar la carga tumoral y por tanto el estímulo necesario para que las células CAR-T produzcan IFN γ . No obstante, no podemos tampoco descartar que quedaran trazas de CM-694 que pudieran ejercer un efecto tóxico sobre las células CAR-T. Para descartar esta posibilidad, en futuros experimentos se cultivarán células CAR-T con el sobrenadante del último lavado de CT pre-tratadas con CM-694 y se estudiará como afecta a la producción de IFN γ por las CAR-T estimuladas con un péptido que contengan el epítipo reconocido por CAR-806. Los mecanismos por los que estas drogas hacen a las CT más sensibles a la actividad lítica de las CAR-T serán objeto de futuros estudios del grupo. Así mismo, se estudiará la capacidad sensibilizadora de otras drogas y el efecto de estas sobre diferentes líneas tumorales de CAM y GBM.

En resumen, hemos establecido un protocolo simple, preciso, sensible y robusto para detectar agentes capaces de sensibilizar a las CT a la lisis por las células CAR-T. Demostramos la eficacia de nuestro protocolo e identificamos dos inhibidores epigenéticos capaces de sensibilizar a las células tumorales a la destrucción por un CAR anti-EGFRvIII. Además, demostramos que estos inhibidores logran la sensibilización a dosis más bajas que las requeridas para inducir toxicidad. En conjunto, nuestro estudio apoya el uso de inhibidores epigenéticos como agentes sensibilizadores a la terapia con células CAR-T.

5. CONCLUSIONES

- 1) Hemos establecido un método simple, preciso, sensible y robusto que permite medir de modo rápido y específico la lisis de las células tumorales por las células CAR-T. Este método facilita el cribado de nuevas drogas que sensibilicen a la célula tumoral a la destrucción por las células CAR-T.
- 2) El IFN γ puede ejercer un efecto sensibilizador o de-sensibilizador sobre las células tumorales, haciendo a estas más sensibles o resistentes, respectivamente, a la lisis por las células CAR-T. Este efecto depende del tipo tumoral y está mediado por mecanismos que no afectan a la activación de las células CAR-T.
- 3) CM-272 y CM-694, ambos inhibidores de DNMT1 y G9a, son capaces de sensibilizar a las células tumorales a la destrucción por las células CAR-EGFRvIII. Ambos inhibidores logran la sensibilización a dosis más bajas que las requeridas para inducir toxicidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Butcher L. Solid Tumors: Prevalence, Economics, And Implications for Payers and Purchasers. 2004.
2. Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10(FEB).
3. June CH, O'connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
4. Pan K, Farrukh H, Chittepu VCSR, Xu H, Pan C xian, Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. Vol. 41, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* BioMed Central Ltd; 2022.
5. Lin H, Cheng J, Mu W, Zhou J, Zhu L. Advances in Universal CAR-T Cell Therapy. Vol. 12, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
6. Xu C, Ju D, Zhang X. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: Challenges and opportunities in lung cancer. Vol. 5, *Antibody Therapeutics.* Oxford University Press; 2022. p. 73–83.
7. Hillerdal V, Essand M. Chimeric antigen receptor-engineered t cells for the treatment of metastatic prostate cancer. *BioDrugs.* 2015 Apr 1;29(2):75–89.
8. Sun S, Hao H, Yang G, Zhang Y, Fu Y. Immunotherapy with CAR-modified T cells: Toxicities and overcoming strategies. Vol. 2018, *Journal of Immunology Research.* Hindawi Limited; 2018.
9. Ma S, Li X, Wang X, Cheng L, Li Z, Zhang C, et al. Current progress in car-t cell therapy for solid tumors. Vol. 15, *International Journal of Biological Sciences.* Ivyspring International Publisher; 2019. p. 2548–60.
10. Khan JF, Khan AS, Brentjens RJ. Application of CAR T cells for the treatment of solid tumors. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier B.V.; 2019. p. 293–327.
11. Lemoine J, Ruella M, Houot R. Overcoming Intrinsic Resistance of Cancer Cells to CAR T-Cell Killing. Vol. 27, *Clinical Cancer Research.* American Association for Cancer Research Inc.; 2021. p. 6298–306.

12. Yan X, Chen D, Wang Y, Guo Y, Tong C, Wei J, et al. Identification of NOXA as a pivotal regulator of resistance to CAR T-cell therapy in B-cell malignancies. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Dec 1;7(1).
13. McKenzie B, Valitutti S. Resisting T cell attack: tumor-cell-intrinsic defense and reparation mechanisms. Vol. 9, *Trends in Cancer.* Cell Press; 2023. p. 198–211.
14. Chulanetra M, Morchang A, Sayour E, Eldjerou L, Milner R, Lagmay J, et al. Original Article GD2 chimeric antigen receptor modified T cells in synergy with sub-toxic level of doxorubicin targeting osteosarcomas [Internet]. Vol. 10, *Am J Cancer Res.* 2020. Available from: www.ajcr.us/
15. Choi BD, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, McLendon RE, Bigner DD, et al. EGFRvIII-targeted vaccination therapy of malignant glioma. In: *Brain Pathology.* Blackwell Publishing Ltd; 2009. p. 713–23.
16. Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, Bigner DD. Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRvIII mutation in patients with malignant glioma. Vol. 20, *Seminars in Immunology.* 2008. p. 267–75.
17. Durgin JS, Henderson F, Nasrallah MP, Mohan S, Wang S, Lacey SF, et al. Case Report: Prolonged Survival Following EGFRvIII CAR T Cell Treatment for Recurrent Glioblastoma. *Front Oncol.* 2021 May 7;11.
18. Chen M, Sun R, Shi B, Wang Y, Di S, Luo H, et al. Antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against EGFRvIII-expressing glioblastoma in C57BL/6 mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2019 May 1;113.
19. Lo HW, Hsu SC, Hung MC. EGFR signaling pathway in breast cancers: From traditional signal transduction to direct nuclear translocalization. Vol. 95, *Breast Cancer Research and Treatment.* 2006. p. 211–8.
20. Chen M, Sun R, Shi B, Wang Y, Di S, Luo H, et al. Antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against EGFRvIII-expressing glioblastoma in C57BL/6 mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2019 May 1;113.
21. Genoud V, Marinari E, Nikolaev SI, Castle JC, Bukur V, Dietrich PY, et al. Responsiveness to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immune checkpoint blockade in SB28 and GL261 mouse glioma models. *Oncoimmunology.* 2018 Dec 2;7(12).
22. Berger G, Knelson EH, Jimenez-Macias JL, Nowicki MO, Han S, Panagioti E, et al. STING activation promotes robust immune response and NK cell-mediated tumor regression in glioblastoma models. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.2111003119>

23. Le Naour A, Rossary A, Vasson MP. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. Vol. 9, *Cancer Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 8074–85.
24. Cao Y, Feng YH, Gao LW, Li XY, Jin QX, Wang YY, et al. Artemisinin enhances the anti-tumor immune response in 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2019 May 1;70:110–6.
25. Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, Vider J, Shavrin A, Beresten T, et al. A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(5):740–51.
26. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN- γ receptors. Vol. 54, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999. p. 1233–51.
27. Lehmann C, Zeis M, Schmitz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells.
28. Ren W, Gao L, Song J. Structural basis of DNMT1 and DNMT3A-mediated DNA methylation. Vol. 9, *Genes*. MDPI AG; 2018.
29. Shankar SR, Bahirvani AG, Rao VK, Bharathy N, Ow JR, Taneja R. G9a, a multipotent regulator of gene expression. Vol. 8, *Epigenetics*. Taylor and Francis Inc.; 2013. p. 16–22.

ANEXO

1. Anticuerpos y tinciones

ANTICUERPO	Ag DIANA	MARCAJE	λ ABSORCIÓN	λ EMISIÓN
Anticuerpo monoclonal de ratón	CD90.1	Ficoeritrina (PE)	496 nm	578 nm
Anticuerpo monoclonal de ratón	CD90.1	AF647	652nm,	668nm
	Marcador de muerte	Zombie Nir ^R	715 nm	743nm
Anticuerpo monoclonal de ratón	CD90.1	Alofocianina APC	652 nm	657 nm
Anticuerpo monoclonal de ratón, con 80.5	EGFRvIII	Ficoeritrina (PE)	496 nm	578 nm

Tabla 1: Anticuerpos y tinciones empleadas en los estudios de citometría de flujo. Los diferentes marcadores empleados presentan longitudes de onda de absorción y emisión diferentes para evitar la interferencia entre ellos.

2. Niveles de expresión de EGFRvIII en las líneas tumorales

En trabajos anteriores del grupo, se modificaron CT de CAM (4T1 y EO771) y GBM (GL261 y CT2A) con un retrovirus (RV) que expresaba el homólogo murino de EGFRvIII y CD90.1 como proteína reportera. Con objeto de conocer el nivel de expresión en superficie del AD del CAR (EGFRvIII), se midió la expresión de EGFRvIII y CD90.1 en dichas CT. Como control se usaron las CT parentales. Para la tinción de EGFRvIII se usó el clon DH8.5 que reconoce el péptido mutado (LEEKKGNVVTDH), presente tanto el EGFRvIII humano como en su homólogo murino. Se observó que todas las CT estaban infectadas (>99% de células CD90.1⁺), si bien variaban en los niveles de expresión de CD90.1 (Fig. S1A). Solo se detectó EGFRvIII en la superficie de las células GL261 y CT2A (Fig. S1B). Curiosamente, estas células son las que presentaban niveles más altos de CD90.1 (MFI de CD90.1 > 5x 10⁵), mientras que las 4T1 y EO771 presenta MFI de CD90.1 < 5x10⁵ (Fig. S1A). Se observó una asociación positiva entre la MFI de CD90.1 y la MFI de EGFRvIII que, aunque no era significativa, rondaba la significancia estadística (R= 0.8657; P= 0.0696) (Fig. S1C). Esta asociación entre niveles de expresión de CD90.1 y EGFRvIII se verifica cuando se analiza la expresión dual de ambos

marcadores en las células GL261 y CT2A (Fig. S1D). La diferencia en la expresión de CD90.1 sugiere que las células GL261 y CT2A se habían infectado mejor, posiblemente integrando muchas copias del genoma del RV en sus cromosomas, mientras que las 4T1 y EO771 se habían infectado peor (menos copias del genoma del RV en su genoma) (Fig. S1E). La detección de EGFRvIII solo en las células GL261 y CT2A sugiere que el método de detección empleado para medir EGFRvIII en la superficie de la célula tumoral es poco sensible y solo en aquellas células con alto nivel de infección (aquellas que presentan MFI de CD90.1 > 5 x 10⁵) es capaz de detectar EGFRvIII.

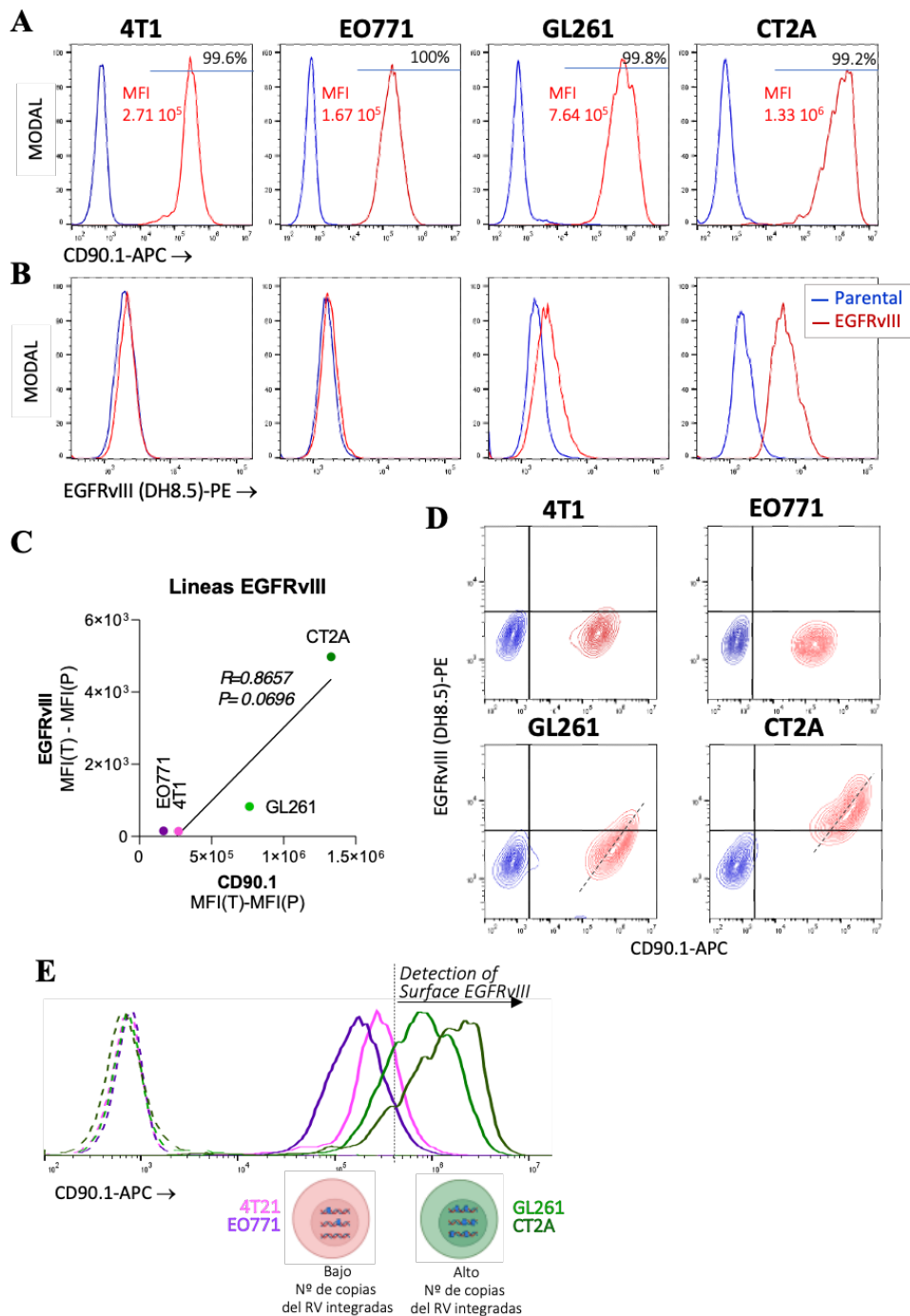


Figura S1: Estudio de la expresión de EGFRvIII en la membrana plasmática de las CT. (A) Representación en histograma del nivel de expresión de CD90.1 en la membrana (parental vs transducidas). El porcentaje indica % de células infectadas (CD90.1⁺) en las células EGFRvIII⁺. Los números en rojo indican La mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) las células EGFRvIII⁺. **(B)** Representación en histograma del nivel de expresión de EGFRvIII en las diferentes líneas (parental vs transducidas con EGFRvIII). **(C)** Representación de la relación lineal entre la expresión de CD90.1 (eje X) y EGFRvIII (eje Y). LA MFI que se presenta para cada parámetro es la diferencia entre la MFI de la línea transducida (T) y la parental (P). **(D)** Pseudoplot donde se muestra la expresión de EGFRvIII y CD90.1 en las diferentes líneas celulares (parental vs transducida). La línea puntuada pretende reflejar la asociación positiva entre la expresión de CD90.1 y EGFRvIII en membrana. **(E)** Representación gráfica del modelo que podría explicar la asociación encontrada entre los niveles de expresión de CD90.1 y EGFRvIII. Brevemente, aunque todas las líneas están infectadas (>99% de células CD90.1⁺) un mayor número de copias del RV integradas en las células GL261 y CT2A explicarían la mayor expresión de CD90.1 y de EGFRvIII, alcanzando este el umbral de expresión necesario para que el sistema de medición usado con el Ab DH8.5 sea sensible.

2. Reacción de la luciferasa para generar luz.

La luz se produce mediante la conversión de la energía química de la oxidación de la luciferina a través de una transición de electrones, formando la molécula producto oxiluciferina. La luciferasa de luciérnaga, una proteína monomérica de 61kDa, cataliza luciferina utilizando ATP-Mg²⁺ como cosustrato. En el ensayo convencional de la luciferasa, se genera una luz que decae rápidamente tras la combinación de la enzima y los sustratos. El sistema de ensayo de luciferasa incorpora coenzima A (CoA) para mejorar la cinética, lo que permite un mayor recambio enzimático y da como resultado un aumento de la intensidad de la luz que es casi constante durante al menos 1 minuto.

El sistema de ensayo de luciferasa produce resultados lineales en al menos ocho órdenes de magnitud. En condiciones óptimas se han detectado menos de 10-20 moles de luciferasa. En general, se puede conseguir una sensibilidad 100 veces mayor que la del ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). (Promega)

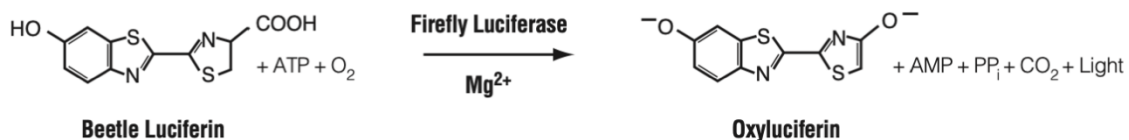


Figura S2: Reacción de luminiscencia catalizada por la luciferasa de luciérnaga. (Promega)

3. EL-4 y CAR-CCR9

Durante mi estancia en el laboratorio, también contribuí en el desarrollo de otra línea experimental, similar a lo que he realizado en mi TFG. Todos los protocolos desarrollados en este estudio fueron los mismos a los ya mencionados. Se modificaron las CT EL-4 (linfoma) con retrovirus anfotrópicos para hacerlas expresar el AD CCR9 frente al que se dinamizaran los CAR-T (Fig. S3A). Posteriormente se estudió el nivel de expresión de GFP en la población EL-4 transluada, la cual se comparó con EL-4 no traducidas. Se obtuvo un nivel de traducción del 99,7% (Fig. S3.B). Se obtuvieron LT que se modificaron con retrovirus ecotrópicos para que expresen el CAR diseñado frente a CCR9 (Fig. S3C). Se estudió el nivel de expresión de GFP en el CAR-CCR9 translucido (96%) y del CAR-CD19 (86%), empleado como control negativo (Fig. S3D).

Una vez se pusieron a punto las líneas tumorales y el CAR-T se co-cultivaron 24h. Con el objetivo de estudiar si existía reconocimiento por parte del CAR-T a la CT. Para ello se estudió la concentración de $IFN\gamma$ en el sobrenadante empleando la técnica ELISA (Fig S3E). Solo se observan niveles de $IFN\gamma$ en el sobrenadante cuando se co-cultivaron EL4-mhCCR9 junto con el CAR-CCR9. De esta forma se demostró que el CAR-CCR9 reconoce EL4-mhCCR9 y se activa.

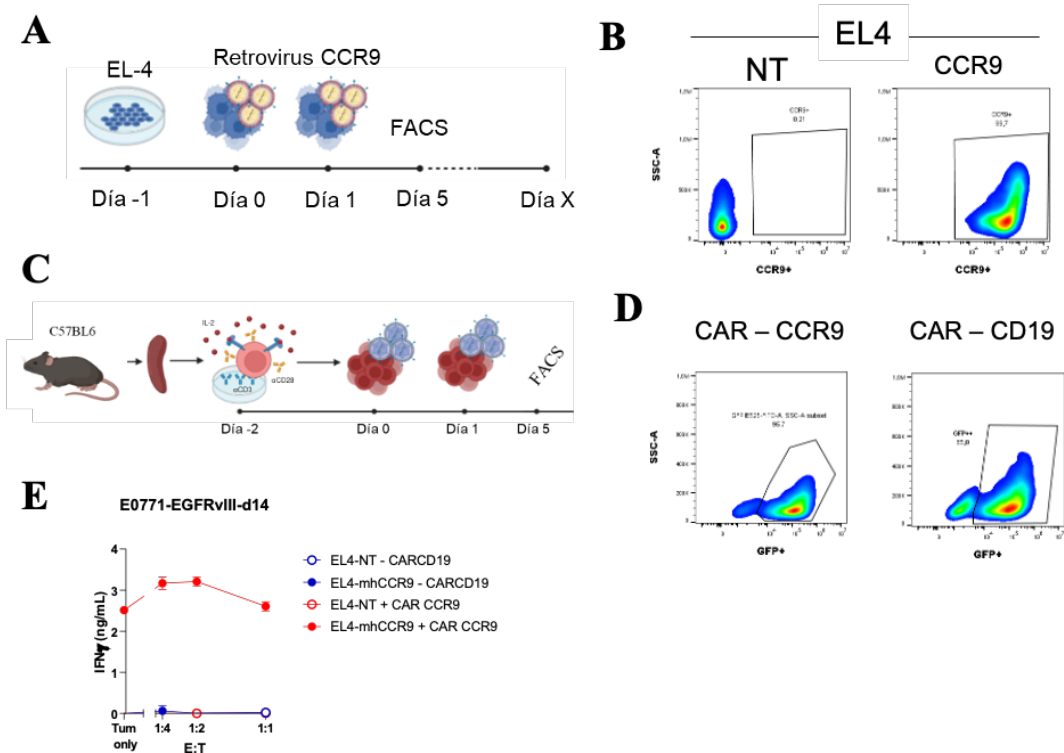


Figura S3: Generación de la línea EL4-CCR9 y el CAR específico de CCR9 y estudio del reconocimiento de la línea EL-4-CCR9 por el CAR-CCR9. (A) Diseño experimental seguido para la transducción de EL-4. (B) Pseudoplot del nivel de expresión de GFP en la línea tumoral no transfectada vs transfectada. (C) Diseño experimental seguido para la producción de células CAR-T. (D) Pseudoplot del nivel de expresión de GFP en el CAR-CD19 y CAR-CCR9. (E) Grafico que muestra los niveles de IFN γ estudiados en el sobrenadante tras el cocultivo de las diferentes líneas con las diferentes células CAR-T