

Linfocitos T en inmunoterapia: TIL, CAR-T y tTcR

E. Azucena González-Navarro

Sección de Inmunoterapia, Servicio de Inmunología, CDB, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona

Resumen

El sistema inmunitario es uno de los sistemas orgánicos que nos garantiza la individualidad, reconociendo nuestro entorno. En los vertebrados está formado por la inmunidad innata, natural o inespecífica, y la inmunidad adquirida, adaptativa o específica. La inmunidad innata es un sistema de acción rápido, que representa la primera línea de defensa del organismo, mientras que la inmunidad adaptativa se genera tras el contacto con los antígenos y, por lo tanto, es más tardía. Los dos tipos de inmunidad mantienen una compleja red de interacciones que permiten su funcionamiento integrado y coordinado en la defensa del organismo frente a agresiones exógenas (infecciones) y endógenas (cáncer). La posibilidad de que respuestas inmunitarias específicas puedan erradicar los tumores ha motivado a lo largo de los años un debate sobre esta hipótesis en el campo de la inmunología tumoral, provocando un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer en los últimos tiempos, pasando desde fármacos tradicionales que se focalizan en un ataque directo frente a las células tumorales hacia la inmunoterapia, con la que se busca potenciar el sistema inmunitario del paciente para que sea este el que ataque al tumor. La evidencia tras varios años de utilizar tratamientos de inmunoterapia nos está llevando a respuestas más eficaces cuando se utilizan combinaciones de fármacos, ya sea dentro del esquema de inmunoterapia o junto con fármacos tradicionales.

Palabras clave: inmunoterapia, CAR-T, TIL, TCR, sistema inmunitario.

Introducción

La inmunoterapia del cáncer se puede definir como cualquier procedimiento que modifique el sistema inmunitario y que afecte de manera negativa al crecimiento de un tumor establecido.

Estos procedimientos pueden ser o no específicos para el tumor.

La inmunoterapia específica implica la utilización de antígenos concretos del tumor como dianas contra las que se quiere dirigir la respuesta inmunitaria^{1,2}.

Neoantígenos

Las células tumorales se dividen y multiplican muy rápidamente, lo que genera una serie de mutaciones, inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, amplificaciones o inversiones, que dan lugar a los neoantígenos. También se pueden generar por alteraciones en la traducción del RNA mensajero, el procesamiento del antígeno para ser cargado en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*), así como en la presentación del antígeno a los linfocitos T. En estos casos, la incorporación de un cambio en la

región codificante de una proteína expresada por el tumor puede causar un incremento en la afinidad del péptido por la molécula de MHC, y por lo tanto una mayor presentación en la superficie, o una alteración en la secuencia de aminoácidos que interaccionan directamente con el receptor de células T (TCR, *T cell receptor*). Se trata de moléculas que solo se expresan en células tumorales, en las que no existe tolerancia frente a ellas, por lo que pueden generar respuestas de alta afinidad. Algunas de estas mutaciones pueden estar directamente implicadas en dicha transformación (mutaciones *driver*) y otras apenas tienen un papel relevante en el proceso (mutaciones pasajeras). Un neoantígeno solo se forma cuando una mutación somática genera un epítipo que es expresado, procesado y presentado por las moléculas del MHC de un paciente dado y reconocido por el repertorio de linfocitos T presente en ese paciente; por lo tanto, cada mutación que se genera aumenta las posibilidades de que se forme un neoantígeno³.

Los neoantígenos se pueden dividir en dominantes, aquellos que inducen de forma espontánea la respuesta

inmunitaria, y subdominantes, aquellos que requieren una inmunización previa para generar una respuesta inmunitaria⁴. Lo interesante de esta clasificación es que si un neoantígeno dominante es eliminado mediante la inmunoección, los neoantígenos subdominantes pueden ser una diana prometedora para la inmunoterapia.

Actualmente se considera la carga mutacional de un tumor como un factor relevante en el resultado de diferentes tratamientos, lo que está reforzando el papel de este tipo de antígenos como dianas en las diferentes estrategias terapéuticas.

Estrategias de inmunoterapia

Inmunoterapia no específica

INTERLEUCINAS

Diferentes interleucinas (IL-2, IL-12, IL-21) se han utilizado a lo largo de los años para el tratamiento del cáncer, con resultados más o menos favorables, pero con efectos adversos graves. En la actualidad, algunas de estas citocinas se utilizan junto con la inmunoterapia celular para potenciar la acción de esta.

INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL

Se han desarrollado anticuerpos que consiguen bloquear las moléculas de expresión inhibitoras de la inmunidad, como CTLA-4 y PD-1/PD-L1, para evitar la inhibición del sistema inmunitario por parte del tumor. El uso de estos fármacos ha demostrado la importancia que tiene el sistema inmunitario en la respuesta antitumoral. Con estos tratamientos se ha observado que, una vez desaparecida dicha inhibición, el sistema inmunitario vuelve a funcionar en condiciones óptimas, con buenos resultados del tratamiento.

Los inhibidores del punto de control (*checkpoint inhibitor*) fueron los fármacos que situaron a la inmunoterapia, hace varios años, como una opción en el tratamiento del cáncer, gracias a las respuestas obtenidas principalmente en el melanoma. Esto posibilitó su uso en otros cánceres menos inmunógenos, obteniendo tan buenos resultados como en el melanoma.

El tratamiento con estos fármacos genera reacciones adversas, sobre todo de tipo autoinmunitario por la inhibición

de la tolerancia inmunitaria. La respuesta al tratamiento en pacientes que desarrollaron efectos adversos de grado II o superior se ha correlacionado con respuestas claramente mejores que las de aquellos pacientes que no presentaron toxicidad⁵.

Una consecuencia importante del uso clínico de estos anticuerpos moduladores del sistema inmunitario ha sido el cambio de paradigma en los métodos de valoración de la respuesta al tratamiento, aceptando una valoración de la respuesta a más largo plazo, ya que las acciones antineoplásicas son indirectas y puede haber un retraso en la aparición de la respuesta (no a 1-3 meses como se valoran las quimioterapias). Este cambio en la valoración de la respuesta da por válidos muchos resultados obtenidos con inmunoterapias celulares que antes no se consideraban eficaces⁶.

Inmunoterapia específica

VACUNAS TERAPÉUTICAS

El uso de células tumorales completas (lisadas o atenuadas) para generar una respuesta inmunitaria antitumoral se viene empleando como abordaje

terapéutico desde hace varias décadas, así como el uso de adyuvantes para potenciar la respuesta, como podrían ser el bacilo de Calmette-Guérin⁷ y el virus de la enfermedad de Newcastle⁸. Debido a la dificultad de trabajar con líneas tumorales y a la posibilidad de generar fenómenos de autoinmunidad a consecuencia de la presencia de antígenos no tumorales en la vacuna de células completas⁹, se ha intentado otro tipo de vacunación utilizando péptidos derivados de antígenos tumorales.

Los nuevos métodos de secuenciación han permitido entender que las mutaciones implicadas en la transformación maligna de las células tumorales tienen una gran relevancia en la inmunidad antitumoral, pudiendo considerarse buenas dianas para el desarrollo de vacunas, ya que son secuencias extrañas para el organismo y, por lo tanto, no se ha inducido tolerancia inmunitaria frente a ellas. Los resultados preliminares de ensayos clínicos en los que se utilizan vacunas basadas en neoantígenos tumorales demuestran que este tipo de vacunas son seguras y pueden inducir respuestas específicas frente al tumor¹⁰.

Se ha intentado desarrollar vacunas que tienen como diana neoantígenos que contienen mutaciones frecuentes¹¹. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones son únicas de cada paciente, y por ello para cada paciente se deben seleccionar los neoepítomos obtenidos de su propio mutanoma que generen una fuerte respuesta inmunitaria. Una gran limitación de este tipo de aproximaciones es que, de todo el mutanoma, solo una pequeña fracción (1%) de neoepítomos son capaces de generar una respuesta inmunitaria espontánea¹².

En la actualidad se está procesando la enorme cantidad de datos obtenidos en relación con neoantígenos para identificar biomarcadores que permitan seleccionar los neoantígenos más inmunógenos sin que generen efectos adversos de autoinmunidad por reacciones cruzadas con su versión no mutada¹³.

TERAPIA CELULAR ADOPTIVA

La inmunoterapia celular adoptiva se puede dividir en dos grandes tipos: linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) y linfocitos T modificados genéticamente.

La principal diferencia entre estas dos terapias es que los TIL son una población policlonal que puede reconocer múltiples antígenos tumorales, mientras que los linfocitos T modificados genéticamente se modifican para que reconozcan una única diana o un número limitado de antígenos.

1) Linfocitos infiltrantes de tumor

Son linfocitos que infiltran los tumores sólidos y pueden crecer en suspensión a partir de la disgregación de los tumores con un medio de cultivo que contenga IL-2¹⁴. Tienen la capacidad de reconocer antígenos específicos de tumor y pueden mantener la lisis específica después de ser expandidos y altamente activados *ex vivo*. Por ejemplo, en pacientes con melanoma, aproximadamente el 70% de los linfocitos obtenidos muestran lisis específica de tumor o secreción de citocinas cuando se exponen al tumor autólogo¹⁵.

El tratamiento con TIL ha demostrado su eficacia y su capacidad antitumoral, pero no ha logrado los resultados esperados. Una nueva estrategia puede centrarse

en seleccionar *in vitro* aquellos clones que reconocen el tumor y muestran una actividad citotóxica contra antígenos después de la expansión de los TIL para mejorar la especificidad de reconocimiento, pero también debe asegurarse que los linfocitos T inoculados lleguen al tumor. El análisis de linfocitos con especificidad antitumoral que expresan TCR específicos de tumor ha permitido definir ciertos elementos que influyen en la eficacia de la inmunoterapia antitumoral con linfocitos T, y con ello diseñar estrategias para maximizar su actividad. La cantidad de linfocitos administrados, y más en concreto el número de linfocitos con especificidad antitumoral, parece asociarse con la eficacia de la terapia, pero también parece tener importancia el grado de diferenciación de estos, ya que se ha observado que a pesar de que la actividad citotóxica de los linfocitos contra el tumor *in vitro* aumenta de manera progresiva con la diferenciación, su actividad antitumoral *in vitro* disminuye¹⁶. El grado de diferenciación está relacionado con la pérdida de su habilidad de producir IL-2, su capacidad proliferativa y su habilidad para

extravasarse a tejidos linfáticos y mediar en la regresión tumoral^{16,17}. Algunas estrategias incluyen la expansión con citocinas alternativas (IL-7, IL-15 o IL-21), la inhibición de la diferenciación farmacológicamente o modificar genéticamente los linfocitos para que expresen TCR con especificidad antitumoral¹⁸.

La administración de quimioterapia o radioterapia puede eliminar células inmunosupresoras y tener un efecto inmunoestimulador a través de la activación de las células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cell*). Además, la necrosis tumoral inducida por la radiación o la quimioterapia causa la liberación de antígenos que pueden ser captados y presentados por las APC, lo que a su vez puede contribuir a la activación de los linfocitos administrados.

También se ha conseguido la expansión de linfocitos antitumorales a partir de sangre periférica mediante la estimulación repetida con un antígeno tumoral *in vitro*¹⁹.

Además, en un gran número de tumores, como el melanoma, el

carcinoma de ovario, el carcinoma de colon y el cáncer de cuello, la presencia de TIL se usa como marcador pronóstico²⁰⁻²².

2) Linfocitos T modificados genéticamente

La terapia génica sobre los linfocitos T es la opción que está acumulando mayores éxitos como inmunoterapias ya aprobadas, incluyendo no solo terapia CAR-T, sino también TcR nuevos o tTCR:

- CAR-T: es el tratamiento celular que está consiguiendo mejores resultados. Consiste en células T modificadas genéticamente que expresan una proteína de fusión formada por los dominios de reconocimiento de un anticuerpo monoclonal (que otorga la especificidad a la célula T), junto con los dominios de señalización. Los CAR-T han ido evolucionando y se habla de diferentes generaciones, cada una de ellas con alguna incorporación respecto a la anterior. Los CAR-T de primera generación solo tenían la molécula que da la

señal de citotoxicidad (CD3), a los CAR-T de segunda generación se les añade una segunda señal (CD28 o CD137) de activación, mientras que los de tercera generación combinan señales de activación (CD28 más CD137). Los CAR-T de segunda generación son los más eficaces y los más ampliamente utilizados en la actualidad. La célula T que expresa el receptor quimérico de antígeno (CAR) tiene la capacidad de reconocer estructuras en la superficie de las células diana sin necesidad de ser presentadas por vía del MHC, ya que el receptor CAR tiene la misma especificidad y «modo de acción» que el anticuerpo monoclonal que le cede la región de reconocimiento²³. La especificidad monoclonal de los CAR representa un ataque muy dirigido a una molécula diana, lo que puede dar lugar a una deriva antigénica por parte del tumor y escapar a la respuesta inmunitaria mediada por CAR. Diferentes puntos dentro de la estructura del CAR-T pueden ser modificados para mejorar su

seguridad, eficacia y aplicabilidad. Se están realizando muchos esfuerzos para conseguir CAR-T universales que puedan ser fabricados a partir de linfocitos T de donantes y ser utilizados a demanda. A pesar de obtener resultados concretos en diferentes ensayos clínicos, su aplicación no será a corto plazo.

- tTCR: son linfocitos T modificados genéticamente que expresan un TCR frente a un antígeno concreto del tumor, rompiendo así la tolerancia al tumor. Este tipo de terapia podría generar una inmunidad de tipo «viral» frente a los antígenos de un tumor²⁴. Diferentes antígenos están siendo utilizados para explorar esta estrategia. Dentro de los de línea germinal se están explorando NY-ESO-1, MAG-A3, MAG-A10, AFP y CEA. En cuanto a los autoantígenos, MART-1 y gp100 son prometedores dentro de esta estrategia. Uno de los inconvenientes de esta aproximación es la generación de

toxicidad, ya que estos antígenos pueden expresarse en órganos sanos causando reacciones de autoinmunidad o reactividad cruzada. Se han reportado algunos casos de respuestas completas tras la utilización de tTCR frente a neoantígenos presentes en los tumores de los pacientes.

Conclusiones

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la inmunoterapia, existen limitaciones para lograr mejores respuestas. Dentro de estas limitaciones cabe destacar la dependencia de la presentación del antígeno por las moléculas del MHC para que pueda ser reconocido por los TIL y los tTCR, así como la necesidad de que el antígeno esté presentado en la superficie celular para ser reconocido por los CAR-T. Sin embargo, en general, la principal limitación de la eficacia de las terapias celulares adoptivas es la heterogeneidad antigénica de los tumores. Por lo tanto, son necesarias nuevas aproximaciones para mejorar las respuestas.

Bibliografía

1. Strønen E, Toebes M, Kelderman S, van Buuren MM, Yang W, van Rooij N, et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science*. 2016;352:1337-41.
2. Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med*. 2013;19:747-52.
3. Bethune MT, Joglekar AV. Personalized T cell-mediated cancer immunotherapy: progress and challenges. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;48:142-52.
4. Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:209-22.
5. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2455-65.
6. Tuma RS. Immunotherapies in clinical trials: do they demand different evaluation tools? *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:780-1.
7. Hoover HC, Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madariaga J, et al. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median follow-up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol*. 1993;11:390-9.
8. Schlag P, Manasterski M, Gerneth T, Hohenberger P, Dueck M, Herfarth C, et al. Active specific immunotherapy with Newcastle-disease-virus-modified autologous tumor cells following resection of liver metastases in colorectal cancer. First evaluation of clinical response of a phase II trial. *Cancer Immunol Immunother*. 1992;35:325-30.
9. Lokhov PG, Balashova EE. Cellular cancer vaccines: an update on the development of vaccines generated from cell surface antigens. *J Cancer*. 2010;1:230-41.
10. Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol*. 2017;18:168-82.
11. Türeci Ö, Vormehr M, Diken M, Kreiter S, Huber C, Sahin U. Targeting the heterogeneity of cancer with individualized neopeptide vaccines. *Clin Cancer Res*. 2016;22:1885-96.

12. Patel SJ, Sanjana NE, Kishton RJ, Eidizadeh A, Vodnala SK, Cam M, et al. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature*. 2017;548:537-42.
13. Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:209-22.
14. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 1984;225:1487-9.
15. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Steven A. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother*. 2003;26:332-42.
16. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2005;115:1616-26.
17. Berger C, Turtle CJ, Jensen MC, Riddell SR. Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:224-32.
18. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Pharmacologic induction of CD8+ T cell memory: better living through chemistry. *Sci Transl Med*. 2009;1:11ps12.
19. Yee C. The use of endogenous T cells for adoptive transfer. *Immunol Rev*. 2014;257:250-63.
20. Liakou CI, Narayanan S, Ng Tang D, Logothetis CJ, Sharma P. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immun*. 2007;7:10.
21. Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun*. 2008;8:16.
22. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009;9:3.
23. Sadelain M, Rivière I. CAR T cells in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2017. Disponible en: https://media.nature.com/full/nature-cms/uploads/ckeditor/attachments/8488/nrd_tcells_dec17.pdf.
24. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314:126-9.