

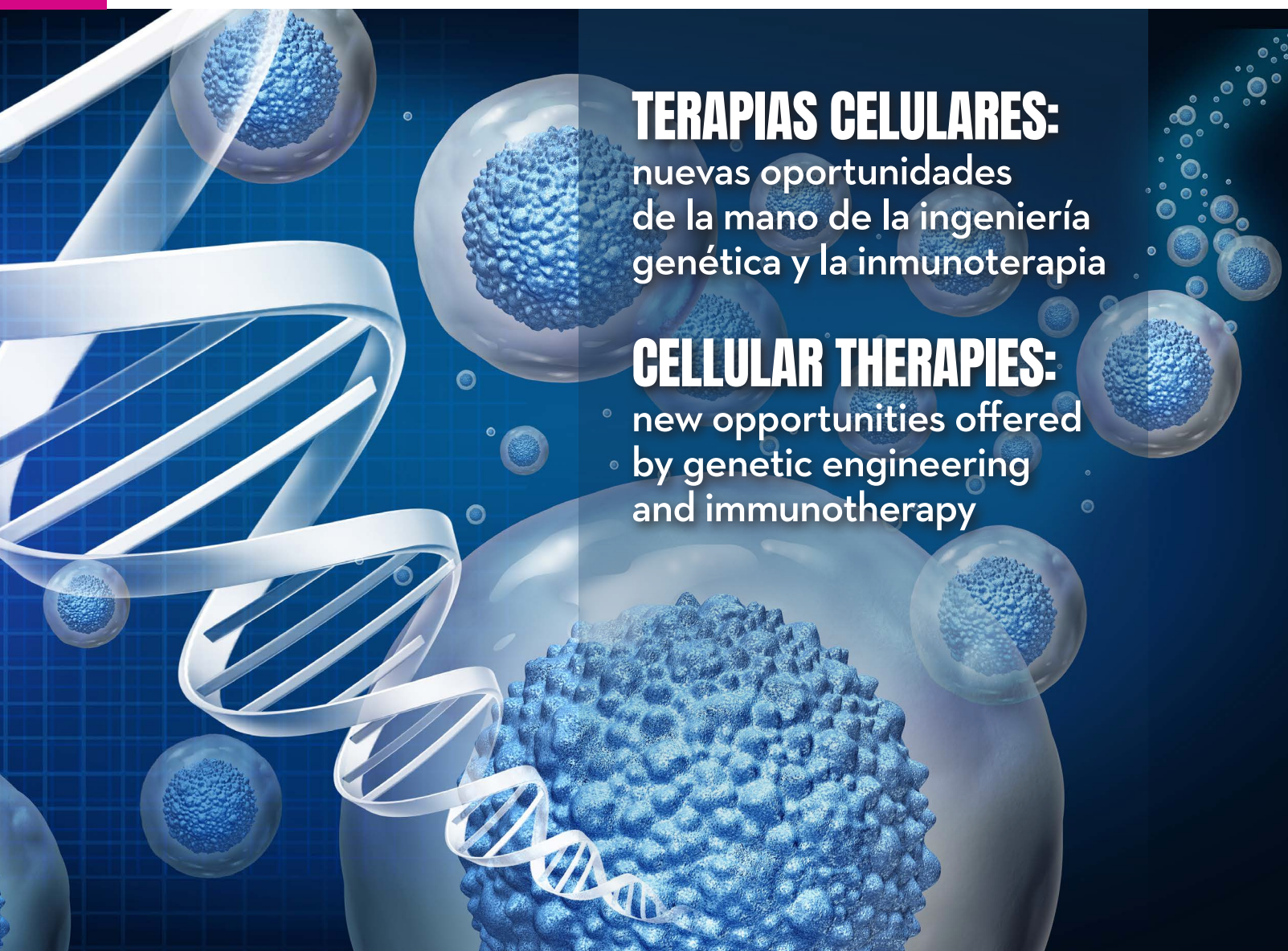
monografía

ciclo de
conferencias y debates en

ciencias

15.^a edición

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
SPRINGER NATURE



TERAPIAS CELULARES:

nuevas oportunidades
de la mano de la ingeniería
genética y la inmunoterapia

CELLULAR THERAPIES:

new opportunities offered
by genetic engineering
and immunotherapy



FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES

SPRINGER NATURE

monografía

ciclo de
conferencias y debates en

ciencias

15.ª edición

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
SPRINGER NATURE

TERAPIAS CELULARES:

nuevas oportunidades de la mano de
la ingeniería genética y la inmunoterapia

CELLULAR THERAPIES:

new opportunities offered
by genetic engineering and
immunotherapy



Jueves, 16 de febrero de 2023

Thursday February 16, 2023



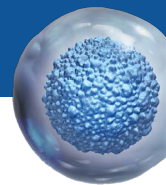
FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES

SPRINGER NATURE

© Fundación Ramón Areces
Vitruvio, 5 - 28006 Madrid (España)
www.fundacionareces.es

© 2023 Springer Healthcare Ibérica, part of Springer Nature group
Rosario Pino, 14 - 4ª planta
28020 Madrid (España)
Tel.: +34 91 555 40 62
www.springerhealthcare.com
www.springernature.com

Depósito legal: M-20031-2023
ISBN: 978-84-09-49783-6
Impreso en España – Printed in Spain



ÍNDICE

TERAPIAS CELULARES: nuevas oportunidades de la mano de la ingeniería genética y la inmunoterapia

PRESENTACIÓN

José María Medina	5
Soledad Santos	6

INTRODUCCIÓN

Erika Pastrana	7
----------------	---

CONFERENCIAS

NUEVAS DIANAS CELULARES Y ESTRATEGIAS DE ADMINISTRACIÓN PARA LA TERAPIA GÉNICA DE CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS	
Dr. Luca Biasco	10

INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS INMUNITARIAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE: UNA PERSPECTIVA ACTUAL	
Prof. Evelyn Ullrich	14

AVANCES EN LA TERAPIA CON LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES SÓLIDOS	
Dra. Elena Garralda	18

DESARROLLO DE FÁBRICAS CELULARES DE CITOCINAS PARA LA INMUNOMODULACIÓN	
Prof. Omid Veisheh	23

DEBATE

Dr. Luca Biasco, Prof. Evelyn Ullrich, Dra. Elena Garralda y Prof. Omid Veisheh, con la moderación de Erika Pastrana	28
--	----

CELLULAR THERAPIES: new opportunities offered by genetic engineering and immunotherapy

PRESENTATION

José María Medina	33
Soledad Santos	34

INTRODUCTION

Erika Pastrana	35
----------------	----

LECTURES

NOVEL CELLULAR TARGETS AND DELIVERY STRATEGIES FOR HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELL GENE THERAPY	
Dr. Luca Biasco	38

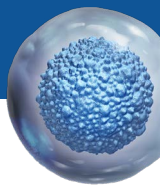
IMMUNOTHERAPY WITH GENETICALLY ENGINEERED IMMUNE CELLS – A RECENT PERSPECTIVE	
Prof. Evelyn Ullrich	42

ADVANCES IN TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTE THERAPY FOR SOLID TUMORS	
Dra. Elena Garralda	46

DEVELOPMENT OF CELL-BASED CYTOKINE FACTORIES FOR INMUNOMODULATION	
Prof. Omid Veisheh	51

DISCUSSION

Dr. Luca Biasco, Prof. Evelyn Ullrich, Dra. Elena Garralda and Prof. Omid Veisheh, moderated by Erika Pastrana	55
--	----



Presentación

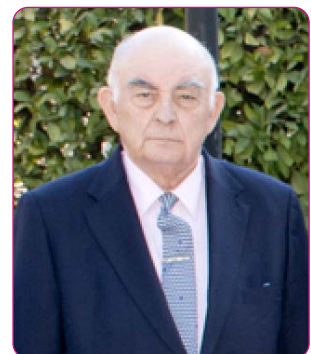
Las **terapias celulares** han protagonizado la **Conferencia-debate** de la **Fundación Ramón Areces-Springer Nature**, que en la presente edición ha recuperado su formato presencial y ha captado el interés masivo de profesionales sanitarios, investigadores y, sobre todo, jóvenes estudiantes e investigadores, interesados en conocer las nuevas oportunidades que surgen de la ingeniería genética y la inmunoterapia. Y, todo ello, de la mano de expertos de referencia y de renombre internacional: **Luca Biasco, Evelyn Ullrich, Elena Garralda y Omid Veisheh**. Cada uno de ellos, desde su ámbito particular de investigación e interés académico, científico y clínico, ha compartido en este foro sus experiencias y ha expuesto sus estudios, puntos de vista, inquietudes y esperanzas.

Como se ha puesto de relieve en esta sesión científica, las terapias celulares han experimentado un crecimiento extraordinario en su aplicación clínica en los últimos años. Y gracias a las nuevas técnicas de ingeniería genética, se posicionan como un tratamiento líder para la cura de ciertos tipos de cáncer, así como de algunas enfermedades neurológicas y autoinmunitarias. En concreto, en esta **15.ª Conferencia** se ha profundizado en las **aplicaciones clínicas actuales de la terapia celular** para el tratamiento del cáncer y se han mostrado los avances en el conocimiento del sistema inmunitario, unos progresos que han permitido el diseño de estrategias más seguras y la aplicación de técnicas de modificación genómica más eficaces. El encuentro también ha servido para debatir y reflexionar sobre las perspectivas futuras que esta tecnología ofrece para hacer frente a enfermedades que, hasta ahora, se consideraban incurables. Y es que los progresos constantes que se documentan en relación con las terapias celulares se postulan como un pilar sólido sobre el que se asentarán muchos de los **tratamientos del futuro** contra enfermedades como el cáncer.

Esta **decimoquinta edición del Ciclo de Conferencias y Debates en Ciencias**, que organizan conjuntamente la **Fundación Ramón Areces** y **Springer Nature**, pone el foco este año en las terapias celulares y en las enormes oportunidades que se vislumbran en este ámbito gracias a los progresos alcanzados en la ingeniería genética y la inmunoterapia.

En ediciones previas, se habían abordado en estos ciclos otros temas de interés científico, como las pruebas genéticas, las aportaciones médicas de la nanotecnología, la medicina personalizada, las enfermedades autoinmunitarias, las enfermedades infecciosas emergentes, los avances en diabetes *mellitus* tipo 2, los retos y progresos en medicina regenerativa, las enfermedades neurodegenerativas y, el año pasado, se profundizó en la captura del CO₂ atmosférico.

En esta ocasión, tanto la **Fundación Ramón Areces** como **Springer Nature** hemos considerado la necesidad de tratar el tema de las terapias celulares por varios motivos, todos ellos de especial relevancia. Las terapias celulares basadas en la administración de células modificadas para combatir la enfermedad se han erigido en un recurso que ha experimentado en los últimos años un enorme crecimiento en su aplicación clínica. Son muchos los ejemplos de éxito que ya se conocen, como el empleo de células genéticamente alteradas (como las CAR-T) para atacar diferentes tipos de tumores, o las células madre para tratar, por ejemplo, la córnea dañada. Precisamente, el principal objetivo de esta jornada ha sido contar con la aproximación científica clínica más sobresaliente para **mostrar algunas experiencias de éxito con terapias basadas en células modificadas para el tratamiento de linfomas y cánceres sólidos**. Creemos sinceramente que, gracias a la colaboración de **Springer Nature**, lo hemos logrado.



José María Medina

Consejo de Ciencias de la Vida y de la Materia
Fundación Ramón Areces, Madrid, España

Tras dos años de formato *online*, la **15.ª Conferencia-debate en Ciencias** de la **Fundación Ramón Areces** y el grupo **Springer Nature** recupera su formato presencial. En la presentación del año pasado, cuando por segundo año consecutivo la pandemia nos obligó a ceñirnos al formato *online*, deseábamos poder volver a ver el auditorio lleno de apasionados por la ciencia. Nos alegramos de que, gracias —entre otros factores— a los avances de la biotecnología aplicada a las vacunas, hayamos casi superado la pandemia de la COVID-19 y podamos volver a disfrutar de esta jornada en su formato tradicional.

Este año se abordan los **progresos registrados en el ámbito de las terapias celulares, con ponentes que muestran los últimos avances en el campo de la inmunoterapia y la ingeniería genética**. Los que habéis asistido a estas conferencias a lo largo de los años, reconoceréis en esta temática nuestra pasión por ahondar en el conocimiento de nuestras propias células para tratar enfermedades, como cuando hace casi una década revisamos los avances en medicina regenerativa o, más recientemente, nos acercamos al estudio de los organoides como posibles nuevas vías de tratamiento.

Los avances en terapia celular y en terapia genética, hoy día, discurren en paralelo. Aunque durante décadas la terapia génica no había conseguido la suficiente eficiencia y seguridad para demostrar un claro beneficio clínico, las mejoras introducidas en las técnicas de modificación genética de las células de nuestro sistema inmunitario han permitido avanzar en su utilización para tratar cánceres hematológicos y tumores sólidos.

En **Springer Nature** estamos comprometidos con difundir y hacer llegar los últimos avances científicos al público en general, además de fomentar y ser vehículo del diálogo entre los científicos académicos, la industria privada y la sociedad. Por ello, a lo largo de este año hemos publicado una serie de colecciones centradas en la ingeniería genética, tanto de vectores virales como de células inmunitarias, dentro de la serie “Collections” de las revistas *Nature*. Estas publicaciones aúnan, no solo el estudio desde la ciencia básica, sino también su aplicabilidad en empresas biotecnológicas y farmacéuticas, todo ello para facilitar la introducción de estas nuevas terapias en la práctica clínica rutinaria.

Un año más, agradecemos a la **Fundación Ramón Areces** la oportunidad de colaborar en estas conferencias. Damos las gracias a su Comité Científico, representado por los profesores **Emilio Bouza** y **José María Medina**, por vuestro compromiso con el avance de la ciencia y la medicina que nos acerca, cada año, a temáticas sumamente interesantes. Agradecemos también al Director General de la Fundación, el **Sr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra**, y al **Sr. Manuel Azcona**, Director de Comunicación, la confianza depositada en nosotros para seguir organizando estas jornadas de las que tanto disfrutamos.

Por último, quisiera agradecer a los ponentes **Luca Biasco**, **Evelyn Ullrich**, **Elena Garralda** y **Omid Veischi** que se hayan desplazado hasta Madrid para compartir con nosotros estas conferencias y su visión de las terapias celulares. Desearía asimismo resaltar la labor en este evento de **Erika Pastrana**, Directora Editorial de las revistas *Nature*; sin duda, es un honor contar con tu buen hacer y pasión por la ciencia.

Soledad Santos

Directora Editorial Iberia y Latinoamérica
Springer Healthcare, a Springer Nature business



introducción



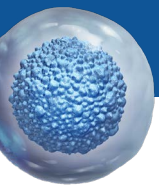
Erika Pastrana

Directora Editorial de *Nature Journals*
Nueva York, EE.UU.

Erika Pastrana es licenciada en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid y se doctoró en Neurociencia en la Universidad Autónoma de Madrid, donde investigó los mecanismos que promueven la regeneración axonal en modelos animales de lesiones del sistema nervioso. Tras su tesis doctoral, Erika realizó su trabajo posdoctoral durante cuatro años en la Universidad de Columbia, en Nueva York, estudiando la neurogénesis y los mecanismos de progresión de linaje neuronal en ratones adultos.

Comenzó su carrera editorial en 2010 como redactora en *Nature Methods*, donde se encargó del área de las neurociencias, trasladándose en marzo de 2014 a la revista *Nature Communications* como *Team Manager*. En abril de 2017 comenzó como *Executive Editor* dentro de la división de *Nature Research Journals* y, en 2019, como *Editorial Director* de las revistas *Nature*, siendo responsable de la gestión y la dirección editorial de ciencias aplicadas y química, que incluyen *Nature Biotechnology*, *Nature Medicine*, *Nature Biomedical Engineering*, entre otras, y más recientemente de *Nature Electronics*, *Nature Mental Health* y *Nature Machine Intelligence*.

Erika forma parte del equipo directivo de *Nature Research* y es responsable del desarrollo y la aplicación de nuevas políticas editoriales, prácticas y flujos de trabajo.



Introducción

Esta es la séptima vez que tengo el honor de ejercer como moderadora de un evento tan importante. En esta nueva edición de la **Conferencia-debate en Ciencias**, que organizamos conjuntamente la **Fundación Ramón Areces** y el grupo **Springer Nature**, contamos con cuatro expertos mundiales en el campo de las terapias celulares, que resumen sus últimos descubrimientos y exponen sus opiniones.

Las terapias celulares, basadas en la administración de células para combatir una enfermedad, han experimentado un crecimiento extraordinario en su aplicación clínica en los últimos años. Las primeras aplicaciones de la terapia celular en humanos comenzaron en 1950, basadas en el trasplante de médula ósea para tratar a pacientes con cánceres hematológicos.

El éxito de estos tratamientos proporcionó años de evidencia del **potencial de las células como agentes para tratar enfermedades**.

Con la aprobación del uso de células CAR-T (*chimeric antigen receptor T cells*), genéticamente alteradas para atacar leucemias y linfomas, y su éxito para tratar cánceres sólidos y líquidos, este campo ha experimentado una explosión sin precedentes y está permitiéndonos alcanzar el hito de convertir el cáncer en una enfermedad curable.

En estas conferencias se sintetizan avances recientes en el uso de células hematopoyéticas alteradas genéticamente para tratar enfermedades genéticas. **También se abordan en detalle los progresos clínicos en la inmunoterapia.** Se destaca cómo **el uso de los biomarcadores y la ingeniería genética** aplicados a las terapias celulares se alzan como nuevas promesas terapéuticas personalizadas.

conferencias

→ NUEVAS DIANAS CELULARES Y ESTRATEGIAS DE ADMINISTRACIÓN PARA LA TERAPIA GÉNICA DE CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Dr. Luca Biasco

Sana Biotechnology, Cambridge, Massachusetts, EE.UU., y University College of London, Londres, Reino Unido

→ INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS INMUNITARIAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE: UNA PERSPECTIVA ACTUAL

Prof. Evelyn Ullrich

Inmunología Experimental, Universidad de Goethe, Frankfurt am Main, Alemania

→ AVANCES EN LA TERAPIA CON LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES SÓLIDOS

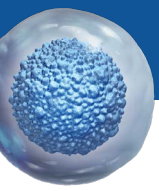
Dra. Elena Garralda

Directora e investigadora principal del Grupo de Desarrollo Clínico Precoz de Fármacos, Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona, España

→ DESARROLLO DE FÁBRICAS CELULARES DE CITOCINAS PARA LA INMUNOMODULACIÓN

Prof. Omid Veischi

Departamento de Bioingeniería, Universidad Rice, Houston, Texas, EE.UU.



Nuevas dianas celulares y estrategias de administración para la terapia génica de células madre y progenitoras hematopoyéticas

Dr. Luca Biasco

Sana Biotechnology, Cambridge, Massachusetts, EE.UU., y University College of London, Londres, Reino Unido

Luca Biasco es actualmente director ejecutivo del programa de I+D de la empresa de terapia génica Sana Biotechnology, con sede en Cambridge, Massachusetts (EE.UU.). Además, es profesor del University College of London dentro del Programa de Terapia Génica del Instituto de Salud Infantil del Hospital Great Ormond Street.

El Dr. Luca Biasco formó parte del grupo científico que desarrolló la primera terapia génica con células madre *ex vivo* aprobada comercialmente en el mundo (Strimvelis™, distribuida por GSK). También fue consultor de GSK en el estudio de la seguridad de la terapia génica con lentivirus para el síndrome de Wiskott-Aldrich.

En el Boston Children's Hospital/Dana Farber Cancer Institute ha sido responsable del equipo del estudio de la seguridad de vectores del programa de terapia génica. Además, en la Facultad de Medicina de Harvard dirigió un laboratorio de investigación centrado en las propiedades de terapias génicas en células madre y su comportamiento *in vivo* tras la infusión en humanos.

El Dr. Biasco detalla en su ponencia los avances en el uso de las células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*) gracias a la terapia génica y presenta las últimas técnicas de administración *in vivo*.

Como explicó, **la hematopoyesis adulta en humanos está organizada de forma jerárquica**. En la cima tenemos las **HSC**, que se generan en la médula ósea y, junto a ellas, los **progenitores multipotentes**, ambos tipos de células pueden sobrevivir mucho tiempo y producir todas las células sanguíneas. Por debajo están los **progenitores eritroides, linfoides y mieloides**, que generan células de una rama concreta de la hematopoyesis.

Los defectos genéticos que afectan a ramas de diferenciación específica derivan en fallos en la reproducción de ciertos grupos celulares (neutrófilos, monocitos, linfocitos, etc.).



Dr. Luca Biasco

De esta forma, se plantea que la terapia génica dirigida al compartimento CD34+, en el que se incluyen las HSPC, podría cambiar el curso marcado por los defectos genéticos.

La manera más común de llevar a cabo esta terapia es aislar las células CD34+ del paciente para añadirles un vector lenti/retroviral con carga útil genética, de modo que se incluye la copia genética correcta del gen mutado. A continuación, se expanden las células CD34+ *in vitro* en un medio selectivo que contiene citocinas para potenciar la transducción. Finalmente, las células CD34+ transducidas son reinfundidas al paciente. Antes de esta reinfusión, al paciente se le administran dosis bajas de quimioterapia para facilitar la proliferación de las células modificadas.

Los vectores más usados en este tipo de terapia son los lenti/retrovirales, ya que:

- 1) poseen una bicapa lipídica que permite su fusión con las células (vector más usado: el VSV-G);
- 2) integran de forma permanente los genes terapéuticos en el genoma del huésped con la incorporación de un provirus y un complejo integrasa en el núcleo de las células hospedadoras, lo que hace que tanto las células tratadas como sus descendientes tengan el gen terapéutico integrado; y
- 3) la integración de la información genética vectorial en el genoma se realiza de forma segura y semialeatoria, ya que el vector puede elegir cualquier lugar para insertar el material genético.

¿Cómo podemos usar esta distribución semialeatoria para rastrear el destino de las células modificadas?

Cada célula tendrá un lugar de inserción único completamente diferente del resto de lugares de inserción de las otras células modificadas, y será el mismo en sus descendientes. En cada una de estas células se encuentra un “código de barras” estable.

Tras haber infundido al paciente con las células modificadas y hacer un seguimiento, se pueden recoger muestras de sangre periférica que tendrán células derivadas de las células madre, mediante una **técnica** denominada “**análisis del lugar de inserción**”. Este proceso se puede monitorizar en el paciente a lo largo del tiempo y determinar cuántos lugares de inserción comparten las diferentes poblaciones celulares. La abundancia (cantidad de células que presentan exactamente el mismo lugar de unión al derivar de la misma HSC) y la diversidad del lugar de inserción se pueden usar para rastrear el estado de una población concreta en el tiempo.

La investigación actual está interesada en la evolución de la población celular de los pacientes sometidos a terapia génica.

Terapia génica *ex vivo* basada en ingeniería genética de células madre y progenitoras hematopoyéticas

La terapia génica HSPC *ex vivo* se ha planteado para tratar inmunodeficiencias primarias. Existen pacientes que nacen con un defecto genético, una mutación en la cadena γ del receptor de interleucina 2 (SCID-X1, *severe combined immunodeficiency-X1*), que provoca la ausencia

de linajes linfoides, por lo que son incapaces de producir linfocitos T, linfocitos B y células *natural killer* (NK).

Se esperaba que al reinfundir células modificadas a los pacientes con ese defecto genético se pudiese recuperar el linaje ausente, además de reforzar al resto de progenitores hematopoyéticos (Figura 1).

A lo largo de dos décadas se siguió la evolución de 10 pacientes tratados con un vector γ -retroviral para transducir células CD34+ *ex vivo*. La infusión se realizó a la edad de 8 meses como promedio y se infundieron una media de $23,9 \times 10^6$ células/kg. No se realizó ningún condicionamiento de los pacientes antes del tratamiento. Todos ellos permanecen vivos y bien hasta el momento. Un paciente desarrolló leucemia linfóide aguda 24 meses tras la terapia génica, pero después de 2,5 años de quimioterapia pasó a un estado de remisión clínica y molecular, y así continuó hasta el último seguimiento. **Este es uno de los primeros ensayos de terapia génica en HSC con un seguimiento a muy largo plazo.**

En la sangre periférica de los pacientes se observaba que solo se producían células T y NK con el gen terapéutico por la persistencia de linfocitos de memoria en la sangre periférica, ya que pueden sobrevivir décadas tras la terapia génica. Sin embargo, no se producían en monocitos, linfocitos B, neutrófilos ni en ningún otro tipo de células sanguíneas. Esto puede deberse a que se han perdido los progenitores multipotentes con supervivencia a largo plazo.

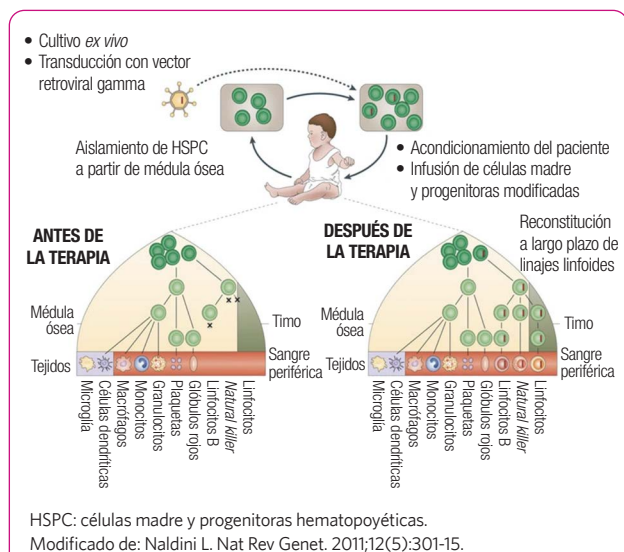


FIGURA 1. Terapia génica de células madre y progenitoras hematopoyéticas *ex vivo* para el tratamiento de inmunodeficiencias primarias.

Si esta hipótesis fuese correcta, solo se deberían detectar células T de memoria en sangre, es decir, ninguna célula T inactivada/*naïve* (TN), ya que estas son de producción reciente en el timo y tienen una vida corta. Se necesitan células madre para que se produzcan estos linfocitos. Al estudiar la población celular de los pacientes, se observó que sí se encontraban células TN que contenían el gen terapéutico. Estas no podían provenir de las células madre modificadas, ya que no perduraban en la médula ósea, por lo que se postuló que existían progenitores linfoides con supervivencia a largo plazo que eran capaces de continuar produciendo las células TN.

Para corroborar que las células TN eran funcionales, se aislaron y se trataron para luego medir la producción de interferón γ (IFN- γ). Al no ser poblaciones de células de memoria, no deberían producir IFN- γ tras la estimulación. Los resultados confirmaron que las células TN obtenidas de los pacientes no producían niveles significativos de IFN- γ , mientras que otros subtipos de células de memoria sí que generaban una respuesta.

También se estudió la reorganización del receptor de células T (TCR) del timo, y se observó que había una alta variedad y diversidad de reorganización del TCR en el compartimento de las células TN en diferentes pacientes y momentos: *se estaban produciendo células TN continuamente en el timo*, formando así nuevas reorganizaciones del TCR.

Estas células TN presentaban el inserto y se podía hacer un seguimiento del lugar de inserción (su diversidad, si hubo o no expansión clonal, los tipos de lugares de inserción de las células TN que se compartían con otros subtipos celulares y datos sobre insertos idénticos en las células TN a lo largo del tiempo). Los resultados de estos análisis sugerían que había 2.000-6.000 progenitores linfoides de supervivencia a largo plazo que continuaban produciendo estas células.

Por último, se compararon los lugares de inserción idénticos entre células T y células NK. Los resultados presentaban un 40% de similitud, por lo que era posible que los progenitores linfoides supervivientes a largo plazo tuvieran un potencial bipotente para producir ambos subtipos celulares: células T y NK. Estos progenitores son independientes de un suministro de células madre.

Los resultados de este primer estudio indican que existe una población de progenitores linfoides de supervivencia a largo plazo (mínimo 15 años), capaz de generar células T y, de forma parcial, NK.

Existen razones para pensar que esta población celular reside en el timo y no en la médula ósea; sin embargo, aún no hay marcadores para identificar y aislar estas células y entender su origen y función.

Experiencia en Sana Biotechnology

Sana Biotechnology está desarrollando una nueva estrategia para lograr la **distribución *in vivo* de la terapia génica**.

La terapia *ex vivo* funciona bien, pero implica grandes costes, la realización de un trasplante autólogo y condicionamiento del paciente a nivel de la médula ósea mediante quimioterapia. Este no es el mejor escenario, ya que puede producirse una elevada toxicidad relacionada con el tratamiento.

Si se pudiese infundir el vector directamente, de forma intravenosa, logrando que llegase a la médula ósea, se obtendría un fármaco mucho más barato, sin necesidad de condicionamiento previo del paciente, e incrementaría el acceso de los pacientes a él.

Para el desarrollo preclínico de este tipo de fármacos existen opciones limitadas: aislar las células madre de un individuo y testarlas *in vitro* o trasplantarlas en modelos animales permisivos (ratones). En nuestra investigación se están usando ambos enfoques para lograr contestar a preguntas clave:

¿Es posible modificar genéticamente las HSPC *naïve* humanas y las HSPC humanas *in vivo* con alta eficiencia y alta especificidad?

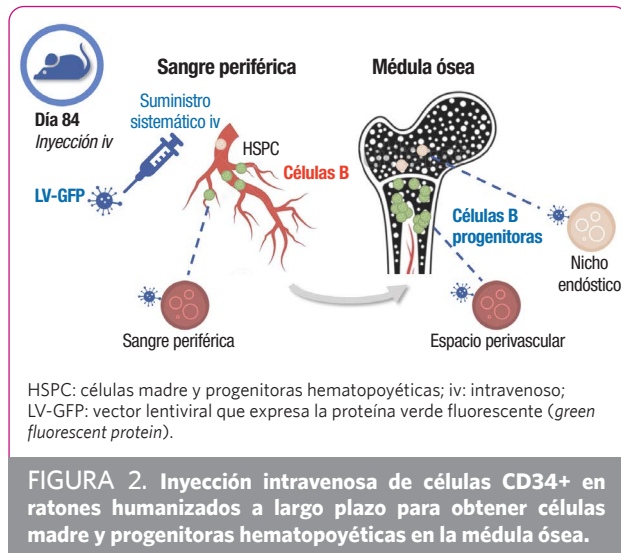
Para transducir las células madre es necesario estimularlas con citocinas, lo cual no se puede hacer *in vivo* porque las células se encuentran en su nicho; es preciso encontrar una forma de llegar a ellas sin activación. Para ello, se testaron y compararon diferentes compuestos. Dos de ellos fueron un vector lentiviral (VSV-G), que requiere activación para su unión a las células CD34+, y un vector derivado de un virus que afecta a babuinos (BaEVTR), que es capaz de transducir de forma efectiva células en reposo. Cuando se usaban estos dos vectores virales en células no activadas, se apreciaba que el virus del babuino funcionaba mejor que la versión lentiviral del vector.

El BaEVTR es capaz de entrar en diferentes subtipos celulares, pudiendo aislar las HSC y progenitores multipotentes de forma específica, transducirlos sin activarlos y obtener un buen nivel de transcripción, incluso con bajas dosis de vector.

Otra característica interesante es que este vector parece ser menos propenso a transducir hepatocitos humanos primarios.

El vector BaEVTR parece ser un candidato adecuado para la modificación *in vivo* de células HSPC humanas.

La forma de comprobar si se pueden obtener HSPC cuando están en la médula ósea es usar ratones humanizados (**Figura 2**).



Se inyectan células CD34+ en el ratón, 12 semanas después se infunde el vector y 12 días después se le sacrifica para ver qué tipo celular se ha transducido. Las células humanas cambian su naturaleza cuando residen en un ratón durante tanto tiempo, pasando a ser la población dominante las células pre-BNK, haciendo que en la sangre periférica se encuentren muchas células B; por lo tanto, esta no es una hematopoyesis humana normal, con un número de HSPC muy reducido. Todos estos factores hacen que el vector se

esté infundiendo en un ambiente con muchas células B y muchos progenitores de células B esperando alcanzar algunas células madre. Con el uso de BaEVTR se logran ya niveles buenos de transducción *in vivo*: hasta el 8% de células humanas en sangre periférica, lo que corresponde a un 2% de células linaje-negativas CD34+, siendo una pequeña fracción de las células en la médula ósea que queremos alcanzar. Se comparó también con el vector VSV-G y se observó que esta tenía un rendimiento muy bajo.

¿Podemos evitar modificar otros tipos celulares diferentes a nuestra diana?

En Sana Biotechnology se están desarrollando **fusógenos** que se incorporan en la membrana del vector. Estos fusógenos contienen zonas de unión diseñadas para reconocer un receptor específico presente en la superficie de la HSC. Tras la unión, se desencadena un cambio en el monómero de fusión asociado a este complejo que fomentaría la unión entre la membrana celular y la membrana viral, logrando la inserción del material genético en las células diana.

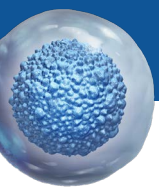
Nuestra plataforma analítica permite evaluar el acceso y el potencial de transducción *on/off* de los fusógenos.

Un ejemplo es el fusógeno B HSC-dirigido, que solo debería transducir células que presenten receptor B. No existen muchas células de este tipo en el ratón (0,6%) y solamente se localizan en la médula ósea, con lo que el vector debe ir desde la sangre periférica hasta la médula ósea y unirse únicamente a estas células específicamente. Cuando se usó el fusógeno B HSC-dirigido, los resultados indicaron un claro enriquecimiento de esta población celular concreta, y mostraron una especificidad *in vivo* destacable.

Los resultados preclínicos parecen indicar que es posible lograr la terapia génica *in vivo*. El objetivo es mejorar y optimizar los resultados con los fusógenos para su aplicación humana y que se desarrollen otros vectores.

Bibliografía recomendada:

Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013;341:6148; Biasco L, Izotova N, Rivat C, Ghorashian S, et al. Clonal expansion of T memory stem cells determines early anti-leukemic responses and longterm CAR T cell persistence in patients. *Nature Cancer*. 2021;2(6):629-42; Biasco L, Pellin D, Scala S, Dionisio F, et al. In vivo tracking of human hematopoiesis reveals patterns of clonal dynamics during early and steady-state reconstitution phases. *Cell Stem Cell*. 2016;19(1):107-19; Biasco L, Scala S, Basso L, Dionisio F, et al. In vivo tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(273):273ra13; Izotova N, Rivat C, Baricordi C, Blanco E, et al. Long-term lymphoid progenitors independently sustain naïve T and NK cell production in humans. *Nat Commun*. 2021;12(1):1622; Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*. 2011;12(5):301-15; Pellin D, Loperfido M, Baricordi C, Wolock SL, et al. A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors. *Nat Commun*. 2019;10(1):2395.



Inmunoterapia con células inmunitarias modificadas genéticamente: una perspectiva actual

Prof. Evelyn Ullrich

Inmunología Experimental, Universidad de Goethe, Frankfurt am Main, Alemania

Evelyn Ullrich es catedrática de Inmunología Celular en la Universidad Johann Wolfgang Goethe, Frankfurt am Main (Alemania). Dirige la Unidad de Investigación de Inmunología Experimental y la Unidad de Supervivencia al Cáncer del Hospital Universitario Goethe de Frankfurt. Se licenció en Medicina en la Universidad Albert Ludwig de Friburgo y recibió formación complementaria en las Universidades de Ratisbona, Erlangen y París. Es especialista en Medicina Interna e Inmunología.

Desde 2012, dirige la Unidad de Inmunología Experimental del Hospital Infantil de Frankfurt, con el apoyo del Centro LOEWE de Terapia Celular y Génica de Frankfurt. Ha participado en la caracterización de los subconjuntos de células *natural killer* (NK) y linfoides innatas.

La investigación actual de su grupo se centra en descifrar la regulación inmunitaria y en desarrollar inmunoterapias centradas en el uso de ingeniería genética en células inmunitarias (CI) para su aplicación clínica.

En su ponencia, la **Dra. Evelyn Ullrich destacó los usos de la ingeniería genética para mejorar la inmunoterapia celular.**

La investigación de las CI comenzó hace 60 años, alcanzándose una serie de logros sorprendentes en los últimos 10 años, siendo posible la modificación de estas células por medio de ingeniería genética. Las células T se descubrieron mediante la descripción microscópica de tejidos tímicos en 1961. Las células NK fueron descritas en 1975 y, desde entonces, es destacable el desarrollo de la terapia adaptativa. Esta aproximación permite tratar a los pacientes inmunodeprimidos o con cáncer usando CI, como las células T o NK. Estas son activadas mediante citocinas y pueden ser modificadas para actuar contra células cancerígenas.

Uno de los mayores avances en la terapia celular fue la **terapia inmunológica basada en células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T)** para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda¹.



Prof. Evelyn Ullrich

CAR-T: un hito en la inmunoterapia celular

En la evolución histórica de la inmunoterapia basada en células destaca el papel recientemente otorgado al **receptor de antígeno quimérico (CAR)**, un tipo de moléculas de fusión cuya diana son moléculas que se encuentran en la superficie de las células tumorales.

Este constructo está compuesto por dominios de activación y dominios de señalización que activa a las CI una vez que estas se encuentran con las moléculas expresadas por las células tumorales que se quieren eliminar. Desde el descubrimiento de estas moléculas hasta su desarrollo para uso clínico ha transcurrido un largo período de tiempo, en el que han intervenido muchos grupos de investigación.

Actualmente, el objetivo es lograr modificar la suficiente cantidad de CAR para que se puedan aplicar en un gran número de pacientes.

Este tipo de abordaje está aprobado por la *Food and Drug Administration* estadounidense y la Agencia Europea del Medicamento^{2,3}. En 2017 se aprobó la primera terapia con células CAR-T, el tisagenlecleucel, y hoy en día hay disponible una selección limitada de productos CAR-T.

La estrategia de tratamiento usando células inmunitarias CAR requiere sangre del paciente o de un donante para aislar células T o NK. Después se introduce el gen que codifica las CAR. Es muy importante que el gen sea seguro y tenga una expresión estable. Esta célula debe producir una población viable que se administre al paciente, que proliferare para que se mantenga activa y sea capaz de reconocer células tumorales. Es un proceso largo, pero muy efectivo. Existe un repertorio creciente de constructos que se pueden usar para transducir estas células que poseen CAR, existiendo varias generaciones que se diferencian en sus dominios coestimuladores de células (Figura 1)⁴.

Actualmente, están en marcha ensayos con células CAR-T en todo el mundo (> 1.000), y tanto los ensayos como las publicaciones sobre este tema están aumentando. Gran parte de los estudios son de fase I-II, cuyos resultados permiten obtener muchos conocimientos. Es esencial que se recopile información sobre los pacientes que han sido tratados con productos CAR-T; sin embargo, aún estamos en el momento de recogida de información, donde la

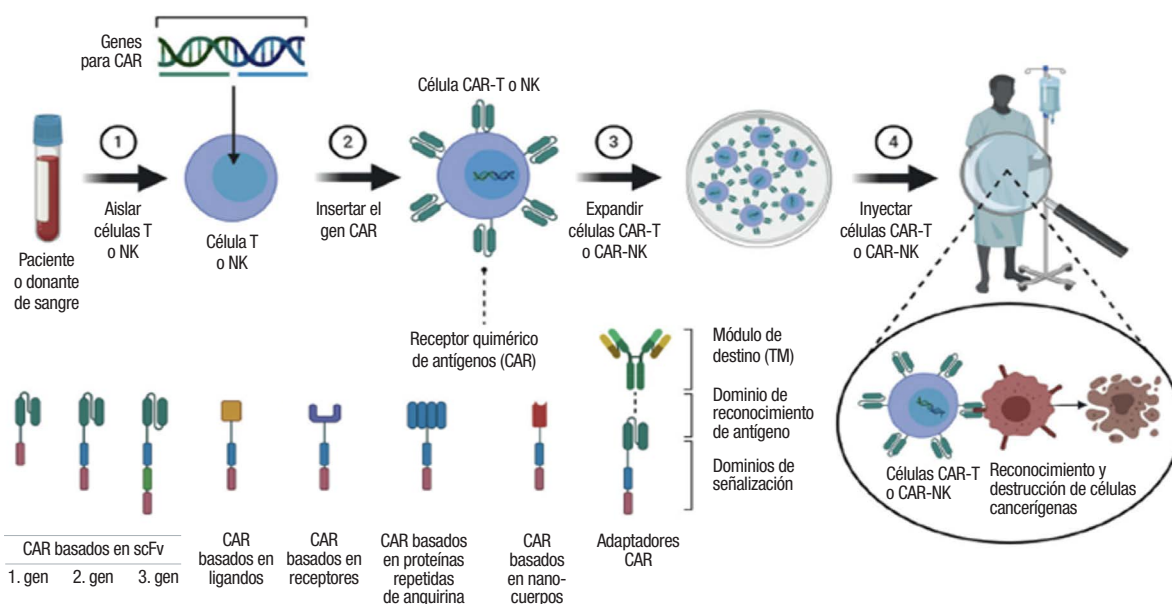
mayoría de los estudios se realizan en un solo centro, de modo que llevará un tiempo comprender los efectos de estos fármacos.

En muchos casos se usan células autólogas, células que provienen del propio paciente y que ha sido pretratado antes de realizarse la extracción de células T. Existen muy pocos estudios en los que se usen células de otra persona. Aunque los ensayos clínicos se centran en una sola diana, es posible abordar múltiples⁵.

Avances y limitaciones

La terapia con células CAR-T está teniendo un éxito importante en el área de la hematología, ya que se trabaja con dianas que son expresadas por la mayoría de las células cancerígenas/leucémicas.

Los tumores sólidos presentan un reto mayor debido a la alta heterogeneidad de expresión antigénica, además del microambiente que los rodea y que es de acceso limitado. Las células de tumores sólidos también pueden regular una reducción de la expresión de ciertos antígenos tumorales y, si el antígeno que se elige para la terapia también lo presentan tejidos sanos, se corre el riesgo de que las células modificadas lo puedan atacar⁵.



CAR: receptor de antígeno quimérico; CAR-T: células T con receptor de antígeno quimérico; NK: *natural killer*; scFV: conector peptídico para formar un fragmento variable de cadena única.

Modificado de: Albinger N, et al. *Gene Ther.* 2021;28(9):513-27⁴.

FIGURA 1. Proceso de desarrollo de los receptores de antígeno quimérico.

Aunque esta terapia es efectiva y segura, se han notificado efectos secundarios derivados del uso de células CAR-T; pero que son de fácil control. Entre estos efectos se encuentran el síndrome de liberación de citocinas, el síndrome de neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunitarias y el síndrome de injerto contra huésped (en el caso de usar células alogénicas para generar las CAR-T)⁶.

Modificación de células *natural killer*

En nuestro laboratorio, se está desarrollando una nueva investigación en la que se pretende modificar, por medio de ingeniería genética, células NK en lugar de modificar células T.

Ambos tipos celulares pueden atacar a las células cancerígenas y generar una respuesta citotóxica contra ellas; sin embargo, los linfocitos T llevan asociado un receptor de células T que requiere presentación antigénica, mientras que las células NK tienen un amplio repertorio de señales inhibitorias y activadoras para distinguir entre células sanas y malignas. Tanto en las células T como en las NK es posible introducir un CAR para apuntar de forma específica a los antígenos de interés. En el caso de las células NK, puede ser beneficioso el hecho de que existan múltiples receptores inhibitorios y activadores adicionales a los CAR, por lo que, si se produce una pérdida de antígenos, las células NK pueden mediar una respuesta citotóxica natural.

Otro punto a favor del uso de estas células es que ya existen estudios previos en los que se ha observado que no producen enfermedad de injerto contra huésped, además de presentar un perfil favorable de citocinas y tener un bajo riesgo de neurotoxicidad⁷.

El hecho de que las células NK presenten señales inhibitorias y activadoras implica que mientras se encuentran en un estado de reposo no atacan; sin embargo, se puede inducir su capacidad de matar mediante la unión de los receptores a moléculas que las activen o interviniendo en las señales de inhibición⁷.

Hoy por hoy, hay pocos ensayos con este tipo celular a nivel mundial y gran parte de ellos aún se encuentran en fase de reclutamiento de pacientes. Hay un estudio norteamericano en el que se usaron CAR-NK en tumores linfoides CD19+, no se observaron efectos secundarios de interés, y la respuesta de los pacientes cumplía con el objetivo en el 73% de los casos. Sin embargo, es un estudio pequeño, con tan solo 11 pacientes⁸.

En la actualidad, se están realizando ensayos para probar la respuesta de las NK frente a diferentes dianas, como CD19, CD70, NKG2D y tumores sólidos, además de otros estudios en los que se está evaluando la actuación de las NK no primarias.

Entre los principales desafíos que se plantean en la inmunoterapia basada en células CAR-NK, y con un futuro prometedor, se encuentran:

- la aplicación de tecnologías virales y no virales para la generación de células CAR-NK, y
- vencer la supresión inmunológica mediante la ingeniería genética.

Otros retos relacionados con las células NK que quedan por afrontar son: su alorreactividad/selección de donantes, su activación (citocinas), y su migración y proliferación.

El **pseudotipado** era una **estrategia para la transducción de productos virales en las CAR-NK** que presentaba un problema al principio; ahora se sabe que la transducción retroviral (RD114-TR) funciona mejor que la lentiviral (VSV-G), permitiendo una mejor introducción de los vectores en las células NK⁹. Pero también existen **estrategias de ingeniería genética no víricas para modificar genéticamente las células NK** que pueden ser más económicas, aunque muchas son inestables.

Algunas de las tecnologías no virales que sí son estables implican el uso de ADN “antiguo”, que emplea la **tecnología llamada “bella durmiente”**¹⁰.

Zoltán Ivics, inventor de esta tecnología, en colaboración con Halvard Bönig de Frankfurt, ha desarrollado una plataforma para la creación de CAR no virales. Esta tecnología está siendo evaluada en el estudio multicéntrico CARAMBA¹¹.

Nuestro equipo ha adaptado esta tecnología para su uso en células CAR-NK. Para lograr esto, se emplearon ratones a los que se les inducía luminiscencia de las células leucémicas (transducidas con luciferasa). Así, es posible monitorizar el progreso de los ratones mediante bioluminiscencia mientras ellos siguen vivos. Cuando se trataron con células NK modificadas, el tumor progresó mucho más lentamente¹¹.

Las ventajas de la estrategia basada en ingeniería CAR no viral son su menor coste y proporcionar un perfil de integración más seguro en las células NK.

Se ha documentado que los genes “belladurmiente” en las células T se integran en puertos genéticamente seguros, algo que también sucede con células NK¹².

Leucemia mieloide aguda

Resultan de especial interés los resultados obtenidos en la leucemia mieloide aguda, que es más difícil de tratar que la leucemia de células B, porque los marcadores que presenta se encuentran también en las células madre hematopoyéticas.

Se han probado células NK modificadas con CAR dirigidas a CD33, mediante la transducción de células NK primarias derivadas de la sangre, utilizando vectores lentivirales pseudotipados de envoltura de babuino (BaEV-LV). Las células transducidas mostraron una expresión de CAR estable, una proliferación sin impedimentos y una mayor actividad citotóxica contra las células OCI-AML2 positivas para CD33 y AML primarias *in vitro*. A su vez, las células CD33-CAR-NK redujeron de forma considerable la carga leucémica y previnieron el injerto de células leucémicas en la médula ósea en modelos de ratón con xenoinjerto OCI-AML2 y sin efectos secundarios observables. Además del incremento de citotoxicidad *in vitro* de las células transducidas, se observaron buenos resultados y regresión en el progreso de la leucemia tras tratar a los ratones con una sola dosis de CAR-NK^{4,13}.

En colaboración con la empresa Miltenyi Biotec, nuestro grupo de investigación trabaja para producir un mayor número de células CAR-NK anti-CD33, llegar a producir las en Frankfurt y poder usarlas en un número mayor de ratones con mieloma múltiple inducido. Se observó que los ratones sufrieron una recaída en la leucemia, lo que podría deberse a un *checkpoint* (NKG2A) que inhibe las células CAR-NK. Este receptor se puede eliminar/silenciar mediante el uso de CRISPR/Cas9.

La edición de genes basada en CRISPR/Cas9 del *checkpoint* inmunitario NKG2A mejora la citotoxicidad mediada por células NK contra el mieloma múltiple, con evidencia de una mejora de la funcionalidad de las CD33-CAR-NK. Las células responsables del mieloma múltiple son atacadas por las células transducidas mediante un marcador de anexina, que solo se puede observar cuando se eliminan las células mediante citotoxicidad¹⁴. También se ha probado en un modelo murino, confirmando que las células doblemente modificadas son más efectivas.

Un hallazgo importante fue que la leucemia reaparecía, pero no en la médula ósea, con lo que se realizó un trasplante de médula ósea para ver si las células madre leucémicas habían sido atacadas, y solo aquellos trasplantados con células CAR-KO alcanzaron una supervivencia del 100%.

Conclusiones y perspectivas de futuro

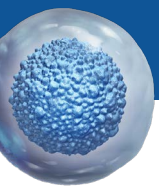
La modificación de células inmunitarias es muy beneficiosa para los pacientes oncológicos, sobre todo, para aquellos con tumores difíciles de tratar. Además de las células T, pueden modificarse otros tipos celulares, lo que permite escoger el más útil para cada entidad tumoral.

Las células CAR-NK se pueden generar a partir de donantes externos, su eficacia se puede mejorar mediante la desactivación específica de algunas vías inmunosupresoras y los análisis de CiteSeq (ARN/Ab-Seq) pueden ayudar a dilucidar los mecanismos subyacentes.

La próxima generación de CAR-NK ofrecerá importantes mejoras como el desarrollo de productos basados en tecnología no viral, integración de citocinas, quimioquinas e integración del interruptor de seguridad, desarrollo de diferentes CAR para neoplasias y la posibilidad de emplear enfoques innovadores combinados.

Referencias bibliográficas:

1. Wendel P, Reindl LM, Bexte T, Künemeyer L, et al. Arming Immune Cells for Battle: A Brief Journey through the Advancements of T and NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1481.
2. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
3. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2011;3(95):95ra73.
4. Albinger N, Hartmann J, Ullrich E. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Ther*. 2021;28(9):513-27.
5. Barros LRC, Couto SCF, Da Silva D, Paixão EA, et al. Systematic Review of available CAR-T Cell Trials around the world. *Cancers (Basel)*. 2022;14(11):2667.
6. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(2):85-96.
7. Reindl LM, Albinger N, Bexte T, Müller S, et al. Immunotherapy with NK cells: Recent developments in gene modification open up new avenues. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1777651.
8. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*. 2020;382(6):545-53.
9. Müller L, Tunger A, Plescia I, Wehner R, et al. Bidirectional crosstalk between cancer stem cells and immune cell subsets. *Front Immunol*. 2020;11:140.
10. Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, et al. CARAMBA: A first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Ther*. 2021;28(9):560-71.
11. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. 1997;91(4):501-10.
12. Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, Schleef M, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral sleeping beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia*. 2017;31(1):186-94.
13. Albinger N, Pfeifer R, Nitsche M, Mertlitz S, et al. Primary CD33-targeting CAR-NK cells for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2022;12(4):61.
14. Bexte T, Alzubi J, Reindl LM, Wendel P, et al. CRISPR-Cas9 based gene editing of the immune checkpoint NKG2A enhances NK cell mediated cytotoxicity against multiple myeloma. *Oncoimmunology*. 2022;11(1):2081415.



Avances en la terapia con linfocitos infiltrantes de tumores sólidos

Dra. Elena Garralda

Directora e investigadora principal del Grupo de Desarrollo Clínico Precoz de Fármacos. Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona, España

La Dra. Elena Garralda es investigadora clínica y directora de la Unidad de Desarrollo Clínico Precoz de Fármacos en el Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona (España), desde 2017. Su carrera se ha centrado principalmente en ensayos de prueba de concepto y prueba de mecanismo con terapias dirigidas, con especial énfasis en las de señalización celular, células madre cancerígenas e inmunooncología, así como en la terapia celular en tumores sólidos.

Actualmente, trabaja en estudios *First-In-Human* de terapias dirigidas, combinaciones eficientes de terapias dirigidas, ensayos clínicos basados en biomarcadores y estudios en poblaciones seleccionadas molecularmente. Uno de los objetivos del grupo de la Dra. Garralda es vincular su investigación clínica con las diferentes áreas de investigación del Instituto y desarrollar mejores terapias para el cáncer adaptadas a las características específicas e individuales de cada tumor.

En su ponencia, **la Dra. Garralda abordó los avances de la inmunoterapia para tratar tumores sólidos.**

Estos avances se están produciendo gracias a la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra el cáncer y mediante una técnica pionera basada en los linfocitos infiltrantes de tumores sólidos (TIL).

En esencia, se trata de penetrar en el tumor con los linfocitos (células inmunitarias que se encuentran mayoritariamente en la sangre), manipulados de forma previa y reactivados en el laboratorio para que aprendan a reconocer y destruir las células tumorales.

Gap terapéutico

Para que cualquier tumor exista, crezca y se mantenga en el tiempo debe ser capaz de evadir el sistema inmunitario.



Dra. Elena Garralda

Con el descubrimiento de los procesos de inhibición del *checkpoint* inmunitario, y la identificación de dos inhibidores del control inmunitario (proteína 1 de muerte celular programada [PD-1] y antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos [CTLA-4]), se inició una revolución en Oncología que facilitó el desarrollo de muchas terapias dirigidas a actuar de manera específica frente a estas dianas.

La principal consecuencia clínica de estos progresos ha sido el **aumento de la supervivencia de los pacientes oncológicos**. En el caso de uno de los tumores más inmunogénicos y que mejor responde a las inmunoterapias disponibles, el melanoma, los resultados a largo plazo en pacientes con melanoma avanzado han mejorado con el uso de un anti-CTLA-4 (ipilimumab), y más aún con un anti-PD-1 (nivolumab), alcanzándose las mayores tasas de supervivencia con la combinación de ambos fármacos. A pesar de estos resultados positivos, el 50% de los pacientes no sobrevivirá más de 5 años¹.

Los resultados aún son menos satisfactorios cuando se emplean estas inmunoterapias en tumores poco inmunogénicos. Tan solo en los carcinomas de células de Merkel se alcanzan tasas significativas de supervivencia de los pacientes (60%), mientras que en el cáncer gástrico, el cáncer de cabeza y cuello o el cáncer de pulmón de células no pequeñas, las tasas de éxito no alcanzan el 20%.

Aunque disponemos de inmunoterapias que han cambiado el manejo del cáncer y mejorado los resultados, todavía queda mucho por hacer².

Aportaciones de las terapias celulares

Las terapias celulares pueden ser la solución para reducir gran parte de la brecha terapéutica contra el cáncer.

En las terapias génicas celulares se emplean células del propio paciente que, una vez modificadas, se reintroducen en su organismo, potenciando su capacidad de lucha frente a los tumores.

Hay distintos tipos de terapias celulares: extraer células de la sangre y modificarlas para atacar un tumor o con la técnica de los TIL.

Las terapias adoptivas de células T para el tratamiento del cáncer se basan en un principio lógico y sencillo. Se extrae una pequeña parte del tumor, donde están los TIL (linfocitos destinados en principio a matar las células tumorales); en el laboratorio se extraen esos linfocitos, se cultivan, se expanden y se reinfunden en el paciente con la esperanza de revitalizarlos y haber aumentado su capacidad para enfrentarse al tumor.

Se ha demostrado que la administración de TIL cultivados de forma natural *ex vivo* facilita la regresión duradera de los tumores de melanoma. Sin embargo, la generación de los TIL no es posible en todos los pacientes y ha tenido un éxito limitado en otros tipos de cáncer.

Los avances en la ingeniería genética han vencido estas trabas mediante la introducción de receptores dirigidos a antígenos tumorales en los linfocitos T humanos. Ahora es posible diseñar genéticamente linfocitos para expresar receptores de células T altamente activos o receptores quiméricos de antígenos (CAR) dirigidos a diversos antígenos tumorales expresados en pacientes con cáncer³.

Promesas y realidades con linfocitos infiltrantes de tumores sólidos

El tratamiento con TIL posee una ventaja importante respecto al resto de terapias oncológicas, y es que solo se administra una vez en la vida.

Los pacientes son hospitalizados durante tres semanas aproximadamente. El proceso de administración es complejo y se desarrolla en tres pasos: **1)** quimioterapia linfodeplectiva (que agota los linfocitos); **2)** infusión intravenosa de TIL expandidos *in vitro* el día 7, y **3)** administración de dosis altas de interleucina-2 (IL-2), que alimentan a los linfocitos para que se expandan y cumplan su función.

Todos los pacientes experimentan efectos secundarios temporales de grado III-IV, por lo que se necesitan equipos especializados. La alta toxicidad, junto con la complejidad de la manufactura y del manejo del tratamiento, es lo que está ralentizando su aplicación clínica. Pese a ello, durante los últimos 5 años se ha registrado un incremento significativo de la investigación con terapias celulares y continúa en alza, originando un verdadero 'tsunami' de ensayos clínicos en los que se prueban estos inhibidores de puntos de control inmunitario.

Dentro de los estudios con inmunoterapias, existe un claro predominio de las terapias celulares, lo que revela el enorme potencial de este tipo de medicina de precisión. También destaca el hecho de que la mayor parte de estos estudios, a diferencia de lo que sucedía en años previos, no proceden de centros académicos, sino que cuentan con un notable apoyo de financiación pública y privada, lo que está acelerando la introducción clínica de estas terapias⁴.

El uso de los TIL en la inmunoterapia de pacientes oncológicos no es nuevo. Estudios clásicos de Rosenberg *et al.* ya mostraban cómo el empleo de TIL y de IL-2 en pacientes con melanoma metastásico producía tasas de respuesta más altas que las logradas con IL-2 sola o con NK activadas por linfocina⁵.

Hay grandes ventajas derivadas de las terapias de células T adoptivas en comparación con otras inmunoterapias.

Las ventajas son tres fundamentalmente:

- 1)** Posibilidad de administrar grandes cantidades de células tumorales específicas.

- 2) Activación de las células T *ex vivo* y su manipulación genética para mejorar su actividad antitumoral.
- 3) Alteración del microambiente inmunitario del huésped antes de la transferencia adoptiva, lo que aumenta las probabilidades de éxito terapéutico.

Con la administración de los TIL una única vez, se logran altas y duraderas tasas de respuesta.

En los últimos años se ha acumulado una amplia experiencia clínica con terapias celulares. En un reciente meta-análisis de Dafni *et al.*, donde se agrupaba la información de los distintos ensayos clínicos de terapia celular en melanoma (la mayoría en fase I-II), se aprecia un claro beneficio de la terapia celular, con tasas de respuesta del 40% (en muchos casos, respuestas prolongadas en el tiempo)⁶.

Se ha publicado un ensayo clínico fase I-II en el que se testaba la eficacia de los TIL en pacientes con melanoma que ya habían recibido previamente *checkpoint inhibitors*, con una buena tasa de respuesta en estos casos del 36% de los pacientes, parcial, pero perdurable en el tiempo. Se estima que hasta el 80% de los pacientes tienen algún tipo de beneficio, aunque sea población pretratada⁷.

Rohaán *et al.* han demostrado por primera vez la eficacia de los TIL en un ensayo clínico fase III: en pacientes con melanoma avanzado, la supervivencia libre de progresión (SLP) fue significativamente mayor entre los que recibieron terapia TIL, como primera o segunda línea, que en aquellos tratados con ipilimumab. La trascendencia de este estudio radica también en el elevado número de pacientes incluidos (> 160) y en el largo período que ha precisado su desarrollo (> 8 años)⁸. En concreto, en este estudio se observa en la población por intención de tratar que:

En población por intención de tratar	Grupo TIL	Grupo ipilimumab
Mediana de SLP	7,2 meses	3,1 meses
Respuesta objetiva	49%	21%
Mediana de supervivencia general	25,8 meses	18,9 meses
Eventos adversos de grado 3 o superior	Todos	57%

SLP: supervivencia libre de progresión; TIL: linfocitos infiltrantes de tumores sólidos.

Estos beneficios de la terapia TIL se mantienen en el tiempo, y gracias a los resultados obtenidos se ha aprobado la primera terapia con TIL en Holanda⁸.

Tendencias actuales y de futuro

Las tendencias en terapia celular se dirigen a superar las limitaciones actuales y mejorar los resultados.

Se extraen TIL de una pieza quirúrgica del paciente y se expanden, pero el objetivo es ser más selectivos en este procedimiento y expandir solo aquellos TIL que realmente reconocen al tumor y que son activos y potentes frente a él.

¿Cómo reconoce un linfocito al tumor? La clave está en el propio receptor. Los **neoantígenos** son alteraciones que tiene la propia célula tumoral y que se van a expresar o se van a mostrar en el receptor de membrana para ser reconocido por el linfocito T.

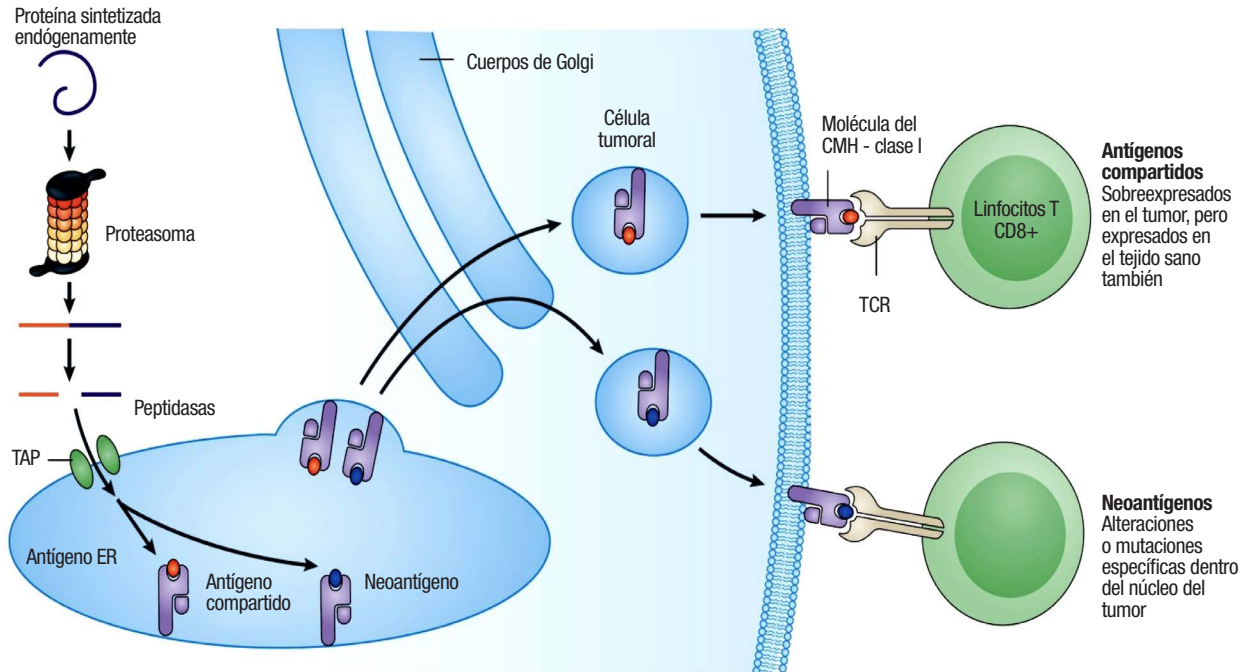
Los TIL pueden reconocer distintos tipos de antígenos: los que son compartidos por células normales (están sobreexpresados en el tumor, pero también se expresan en el tejido sano), y los que reconocen a los neoantígenos (alteraciones o mutaciones específicas dentro del núcleo del tumor).

Ya se cuenta con evidencias sobre cómo es este tipo de reconocimiento de neoantígenos que prima la respuesta T en la terapia celular (**Figura 1**)⁹.

Hoy día se considera que los **neoantígenos son dianas óptimas para la inmunoterapia contra el cáncer** por varios motivos:

- Las células T que se dirigen a los neoantígenos no están sujetas a tolerancia central, son seguras.
- Los linfocitos específicos del neoantígeno se pueden detectar en el 82% de los pacientes examinados con cáncer, independientemente de su carga de mutación o histología¹⁰.
- La infusión de células T dirigidas a neoantígenos ha demostrado eficacia antitumoral en pacientes seleccionados con tumores epiteliales.
- La carga mutacional y de neoantígenos está asociada en el melanoma con la respuesta clínica a la terapia con TIL.

Una de las líneas de investigación en el VHIO es identificar qué antígenos son capaces de provocar una respuesta antitumoral robusta. El proceso que se sigue es el siguiente: a partir de una biopsia del tumor de los pacientes, se aíslan y extraen los TIL y se expanden. La biopsia tumoral es secuenciada para determinar los neoantígenos más probables; después, estos se transfectan en células B para presentarlos a los TIL.



CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; TAP: transportador asociado al procesamiento de antígenos; TCR: receptor de células T.
Adaptado de: Yarchoan M, et al. Nat Rev Cancer. 2017;17(4):209-229.

FIGURA 1. Terapias con células T adoptivas para el tratamiento del cáncer.

Se simula en el laboratorio, pudiendo así escoger aquellos linfocitos seleccionados por neoantígenos.

Este abordaje ya se había probado con éxito en los estudios clásicos de Tran *et al.*, que confirmaron que una respuesta de los linfocitos T CD4+ contra un antígeno mutado puede aprovecharse para mediar en la regresión de un cáncer epitelial metastásico¹¹.

La terapia TIL de próxima generación dirigida a neoantígenos plantea algunas ventajas potenciales:

- **Abordaje menos invasivo** al generar TIL a partir de biopsias, y no de resecciones tumorales.
- **Terapia más segura**, ya que los neoantígenos se expresan en exclusiva en las células tumorales.
- **Más potente**, al no agotarse los receptores de células T que se dirigen a los neoantígenos debido a la tolerancia central.
- **Diversa y heterogénea** (población variada de TIL dirigida a múltiples neoantígenos).
- **Ayuda para una amplia población de pacientes** con necesidades clínicas insatisfechas.

Next-Generation TIL

Está en preparación un artículo que recoge la experiencia del VHIO en el ensayo **Next-Generation TIL**. Se han escogido tumores de 154 pacientes para realizar una expansión efectiva de los TIL del 82% de las biopsias tumorales (de forma independiente al tipo de tumor y a las terapias recibidas con anterioridad). Estos TIL expandidos son reactivos frente a líneas tumorales autólogas que se habían generado de la misma biopsia del paciente. Seguidamente, se evaluaron las alteraciones existentes, confirmando que los linfocitos pueden realmente reconocer los neoantígenos específicos de cada paciente concreto.

Con estos prometedores resultados, y gracias al apoyo y a la financiación de las instituciones públicas y privadas, se ha logrado abrir este ensayo clínico con más de una decena de pacientes tratados. **Este abordaje centrado en crear TIL reactivos contra antígenos** está siendo desarrollado también por otros grupos de investigación como Achilles Therapeutics con dos ensayos: el estudio CHIRON en cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado, y el estudio THETIS en melanoma.

Estrategias para mejorar la eficacia de los linfocitos infiltrantes de tumores sólidos

- 1) El **bloqueo de puntos de control inmunitarios y la provisión de coestimulación**, sobre la base de que podría aumentarse la eficacia si se combinan los *check-points inhibitors* con los TIL^{12,13}.
- 2) Las **aportaciones procedentes de la ingeniería genética** al modificar los TIL para reforzar las células T y su eficacia antitumoral¹².
- 3) El **desarrollo de terapias celulares** a partir del reco-

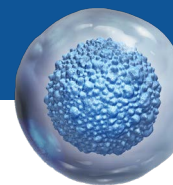
nocimiento e identificación de neoantígenos, no en el tumor, sino en la sangre periférica¹⁴.

- 4) La **disminución de la toxicidad de la terapia celular basada en TIL**, que se debe en la mayor parte de los casos a la acción de la IL-2, optando por nuevas IL modificadas (estudio PragmaTIL).

La terapia celular con los últimos avances registrados se está convirtiendo en algo rutinario y próximo a la práctica clínica. Sin duda, aumentará el número de pacientes que se pueda beneficiar de ella¹⁵.

Referencias bibliográficas:

1. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, González R, Grob JJ, et al. Long-term outcomes with nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2022;40(2):127-37.
2. Mishima S, Taniguchi H, Akagi K, Baba E, et al. Japan Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion for the diagnosis and use of immunotherapy in patients with deficient DNA mismatch repair tumors, cooperated by Japanese Society of Medical Oncology. *Int J Clin Oncol.* 2020;25(2):217-39.
3. Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol.* 2011;29(11):550-7.
4. Upadhaya S, Neftelinov ST, Hodge J, Campbell J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(7):482-3.
5. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988;319(25):1676-80.
6. Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourti Z, et al. Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2019;30(12):1902-13.
7. Sarnaik AA, Hamid O, Khushalani NI, Lewis KD, et al. Lifileucel, a Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy, in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2021;39(24):2656-66.
8. Rohaan MW, Borch TH, Van den Berg JH, Met O, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte therapy or ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2022;387:2113-25.
9. Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, Laheru DA. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. 2017;17(4):209-22.
10. Parkhurst MR, Robbins PF, Tran E, Prickett TD, et al. Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1022-35.
11. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science.* 2014;344(6184):641-5.
12. Mardiana S, Solomon BJ, Darcy PK, Beavis PA, et al. Supercharging adoptive T cell therapy to overcome solid tumor-induced immunosuppression. *Sci Transl Med.* 2019;11(495):eaaw2293.
13. Hulen TM, Chamberlain CA, Svane IM, Met O, et al. ACT Up TIL Now: The Evolution of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Adoptive Cell Therapy for the Treatment of Solid Tumors. *Immuno.* 2021;1(3):194-211.
14. Gros A, Tran E, Parkhurst MR, Ilyas S, et al. Recognition of human gastrointestinal cancer neoantigens by circulating PD-1+ lymphocytes. *J Clin Invest.* 2019;129(11):4992-5004.
15. Coukos G. TIL Therapy Entering the Mainstream. *N Engl J Med.* 2022;387(23):2185-6.



Desarrollo de fábricas celulares de citocinas para la inmunomodulación

Prof. Omid Veisheh

Departamento de Bioingeniería, Universidad Rice, Houston, Texas, EE.UU.

El Prof. Veisheh es doctor por la Universidad de Washington. Investigador y profesor de Bioingeniería en la Universidad Rice, Houston (Texas, EE.UU.). Con más de una década de experiencia en el desarrollo de biotecnologías para su aplicación clínica, cuenta con 20 patentes registradas, algunas ya concedidas. Desde 2017, es profesor de la Universidad Rice en Houston (Texas).

Centrado siempre en el desarrollo de plataformas biotecnológicas, los resultados de su investigación posdoctoral sobre terapias celulares sirvieron de base para el desarrollo de la compañía Sigilon. El Prof. Veisheh trabajó en un páncreas bioartificial para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Además, ha diseñado una línea *high-throughput* para la síntesis y evaluación de formulaciones de materiales que resisten las reacciones a cuerpos extraños.

Su laboratorio utiliza técnicas avanzadas de nano, micro y macrofabricación, en combinación con ingeniería y biología celular, para desarrollar plataformas de dispositivos implantables diseñados para la detección química *in vivo* y la administración de terapias. La investigación del Prof. Veisheh se centra especialmente en tecnologías para mejorar el tratamiento del cáncer, la diabetes tipo 1, la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias.

El Dr. Veisheh mostró el empleo de materiales avanzados en combinación con ingeniería genética para crear una nueva generación de terapias celulares. Sus trabajos traslacionales se centran en la empresa biotecnológica Sigilon Therapeutics de Cambridge (Massachusetts, EE.UU.). El objetivo fundamental de la compañía es tratar de acercar lo más eficaz y rápidamente posible los fármacos biológicos más avanzados al paciente, lo que conlleva grandes esfuerzos. Este proceso resulta complejo por la necesidad de aislar y purificar estas células, colocarlas en viales, determinar las dosis adecuadas, asegurar la estabilización y la posibilidad de readministración al paciente y siempre con garantía de la máxima seguridad.



Prof. Omid Veisheh

Beneficios del abordaje tecnológico

Se están logrando avances en la búsqueda de formas innovadoras de desarrollo de la nueva generación de terapias celulares avanzadas y progresos en las opciones de combinación de células diana con biomateriales.

Se pretende trasladar los beneficios de estos avances al paciente de forma más temprana y rápida, y con ello mejorar la logística y el precio. Para lograr el objetivo, el **abordaje tecnológico** resulta clave porque permite encapsular e implantar células que produzcan enzimas terapéuticas, anticuerpos, hormonas y medicamentos dentro del propio cuerpo cuando este los necesita.

Esta forma de proceder aporta, en principio, grandes beneficios como la mejora de los resultados para el paciente

en comparación con el estándar actual de terapias biológicas, una durabilidad programable o la consecución de niveles séricos de proteínas a un ritmo constante; incluso es posible contar con un agente terapéutico para enfermedades antes intratables y conseguir localmente una mayor concentración de una determinada proteína.

Un ejemplo reciente se encuentra en el campo de la diabetes al haberse demostrado que los polímeros inmunomoduladores permiten el control glucémico a largo plazo. Vegas *et al.* han mostrado la primera corrección glucémica a largo plazo de un modelo animal diabético e inmunocompetente que utiliza células SC- β humanas. Los implantes de estas células (encapsuladas con derivados de alginato capaces de mitigar las respuestas de cuerpo extraño *in vivo*) en el espacio intraperitoneal de ratones C57BL/6J tratados con estreptozocina (un modelo animal para la diabetes tipo 1 provocada químicamente) indujeron la corrección glucémica sin ningún tipo de inmunosupresión hasta su retirada, a los 174 días después de su implantación.

Las concentraciones de péptido C humano y la sensibilidad a la glucosa *in vivo* demostraron un control glucémico terapéuticamente relevante, y los implantes recuperados después de 174 días contenían células productoras de insulina viables¹.

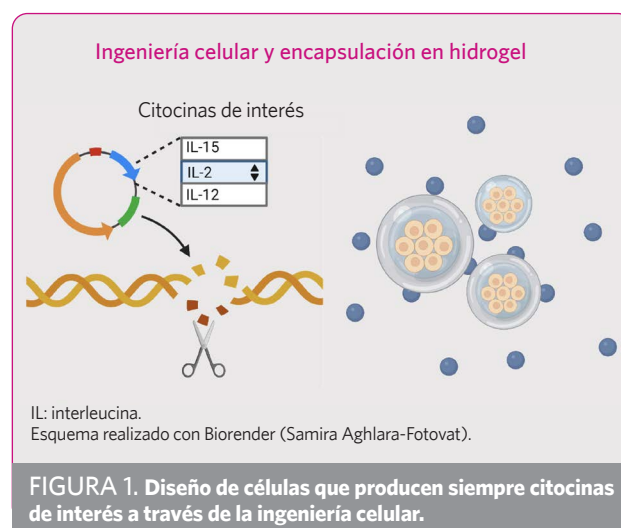
Avances en la inmunoterapia para el cáncer

La **respuesta a cuerpo extraño** es una reacción mediada por el sistema inmunitario que puede provocar el fallo de los dispositivos médicos implantados y la incomodidad del receptor. Por ello, existe la necesidad de contar con **biomateriales** que superen este desafío en el desarrollo de dispositivos médicos. Teniendo esto en cuenta, Vegas *et al.* han generado una gran biblioteca de variantes de uno de los biomateriales de hidrogel más utilizados, el alginato. Tras la evaluación de los materiales *in vivo*, se ha logrado identificar tres análogos que reducen sustancialmente las reacciones a cuerpos extraños en roedores y, durante al menos 6 meses, en primates no humanos. Se crea una superficie de hidrogel única que inhibe el reconocimiento por parte de los macrófagos y la deposición fibrosa. Así, por ejemplo, se podría controlar la duración de la actividad de la terapia².

A partir de este enfoque se abre un amplio abanico de opciones para el descubrimiento de otros materiales que logren este mismo efecto.

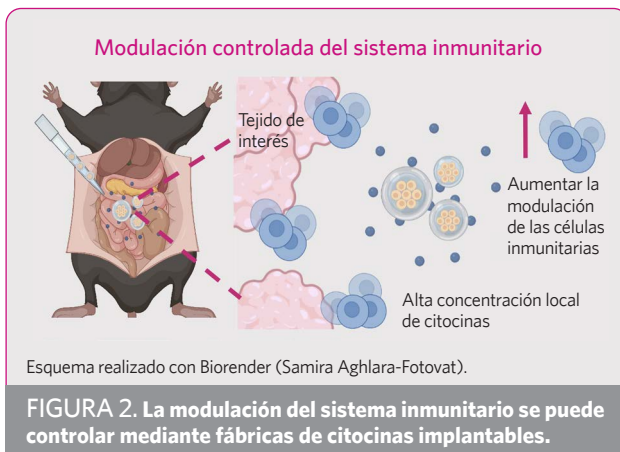
La terapia con citocinas también es un campo de investigación muy interesante. Se está trabajando en el control exógeno de los estados de activación del sistema inmunitario utilizando fábricas de citocinas implantables.

A través de **ingeniería celular** se diseñan células que producen siempre citocinas de interés, encapsuladas en hidrogel biocompatible que las protege del sistema inmunitario del huésped (**Figura 1**).



La interleucina 2 (IL-2) es una molécula mensajera muy potente que está implicada en la activación de las células inmunitarias, en particular los linfocitos T, los macrófagos y las células *natural killer* (NK); la activación de estas células potencia su acción frente a las células tumorales. Sin embargo, históricamente esta citocina se ha administrado a través del torrente sanguíneo y de manera poco selectiva; en la sangre existen muchos reservorios de células inmunitarias, que se activan todos de forma simultánea, ayudando a generar “tormentas de citocinas” y, por tanto, limitando su utilidad terapéutica. Por eso este tipo de abordaje requiere generalmente un ingreso hospitalario y una dosificación muy cuidadosa en el cuerpo.

Para probar el efecto de la **modulación controlada del sistema inmunitario**, se desarrollan modelos animales de enfermedad y se cuantifica el grado de activación/represión del sistema inmunitario a lo largo del tiempo tras la administración (**Figura 2**).



Las citocinas funcionan de forma diferente en el cuerpo humano. Se producen normalmente a nivel local en distintos lugares, tienen una vida corta y su inicio de acción es muy rápido. Para incorporar en el cuerpo humano citocinas se requiere una inyección.

Una limitación importante de las terapias convencionales basadas en citocinas sistémicas es que la inestabilidad inherente de estas requiere altas dosis, así como frecuentes inyecciones/infusiones.

Partiendo de esa realidad, el grupo de investigación del Prof. Veisheh ha abordado este aspecto bajo un prisma diferente, **creando fábricas donde producir las citocinas a nivel local y que se mantienen fuera del torrente sanguíneo**. Su plataforma puede ciclar, validar y testar muy rápidamente distintas citocinas de individuos diferentes o combinaciones de varias.

Muchos ensayos clínicos en humanos han evaluado las terapias con citocinas para el cáncer y las enfermedades autoinmunitarias. De ellos, resultan de especial interés los trabajos llevados a cabo en cáncer de ovario, donde el diagnóstico suele ser tardío, el pronóstico general malo y la recurrencia rara vez es curable. A pesar de la existencia de numerosos recursos, los resultados son bastante mejorables³. Sin embargo, la administración intraperitoneal de IL-2 se ha mostrado prometedora en los ensayos clínicos de fase II. Se ha observado que las infusiones intraperitoneales semanales de IL-2 en pacientes con cáncer de ovario con enfermedad persistente (resistente al platino) o progresiva (refractaria al platino) se asocian con una tasa de respuesta general del 25%, con una mediana de supervivencia de 2,1 años⁴. También se ha confirmado que 16 infusiones semanales de IL-2 administradas a través de un catéter peritoneal permanente con 2 litros de dextrosa estéril al

5% tienen el potencial de lograr remisiones duraderas en el cáncer de ovario (un caso con 14 años de remisión) y escasa toxicidad, aunque planteando importantes inconvenientes (solo el 55% de los casos completó las 16 semanas, la mayoría de las pacientes experimentaron algunos fallos mecánicos en el catéter y dolor por infusión)⁵. A pesar de estos avances, se necesitan métodos avanzados de administración de estas interleucinas.

Nuevas perspectivas

Para superar las dificultades actuales, se pretende la instauración de **'fábricas' de citocinas** que administren una dosificación potente, persistente y regulada a la cavidad que contiene el tumor, lo que disminuye sustancialmente la cantidad de IL-2 que se precisa administrar.

Todo ello por medio de pequeñas 'perlas' o cápsulas (cada una de 1,5 mm), que alojan miles de células modificadas con ingeniería celular y que son capaces de generar citocinas naturales.

Nash *et al.* han publicado recientemente el resultado obtenido con una plataforma de administración de estas 'perlas' de citocinas para la erradicación de tumores intraperitoneales, trasladable a la práctica clínica y que supera las limitaciones asociadas al tratamiento convencional con citocinas (infusiones de dosis altas que pueden generar anticuerpos frente al fármaco y/o efectos secundarios sistémicos que reducen los beneficios a largo plazo)⁶.

Esta plataforma de administración de citocinas estaba integrada por células humanas ARPE-19 (RPE, *retinal pigmented epithelial cells*) que producen citocinas naturales encapsuladas en polímeros. La administración de estas cápsulas adyacente al tumor logra una modulación de dosis con control espacial y temporal, que permite la inmunoterapia contra el cáncer peritoneal sin toxicidades sistémicas.

La terapia con la fábrica de citocinas productoras de IL-2 erradica los tumores peritoneales de ovario y colorrectales en modelos de ratones.

El modelado farmacocinético computacional predice la traducibilidad clínica a humanos. Esta plataforma consigue provocar respuestas de células T en *natural health products*, en consonancia con los biomarcadores que informan de la eficacia del tratamiento sin toxicidad. Esto confirma la seguridad y eficacia de las fábricas de citocinas IL-2 en

modelos animales preclínicos, que revela una producción sostenida de IL-2 nativa (hIL-2) y con una alta concentración en el espacio intraperitoneal, lo que justifica el inicio de ensayos clínicos en humanos⁶.

Recientes investigaciones han corroborado que la dosificación de citocinas *in vivo* se puede controlar modulando el número de cápsulas por dosis. La concentración local de citocinas es al menos 100 veces mayor que las concentraciones sistémicas derivadas de dosis múltiples. Los gradientes de concentración de citocinas son cruciales para la activación suficiente de las células inmunitarias sin causar la toxicidad generalizada que se observa con las inyecciones sistémicas. La capacidad de administrar más de una dosis de estas fábricas de citocinas implantables aumenta la traducibilidad de la plataforma y, además, destaca una posible falta de formación de anticuerpos antifármacos⁶.

El hecho de poder producir el fármaco biológico a nivel local (en el lugar del tumor), ofrece otras muchas posibilidades.

Al poder producir en altas concentraciones la citocina natural que genera nuestro cuerpo, se consigue potenciar el efecto antitumoral y se vislumbran otras posibles ventajas relacionadas con la eficacia⁶. La citocina nativa (hIL-2) alcanza una potencia tres veces mayor que la recombinante (rIL-2).

Cáncer de ovario y cáncer colorrectal

Se desarrolló un modelo en cáncer de ovario y se puso en marcha el estudio ID8 Fluc IP para comparar los efectos antitumorales de la monoterapia *in vivo* de RPE-IL2 con las inyecciones rIL-2.

Este estudio usa células ID8 que expresan luciferasa de luciérnaga. En ratones C57BL/6 (desarrollan tumores similares a los observados en mujeres con cáncer de ovario en estadios III y IV) se inyectaron células Fluc 5e6 ID8 en el espacio intraperitoneal. Una semana después de la inyección, se tomaron imágenes con el sistema IVIS® (*In Vivo Imaging System*) para calcular la carga tumoral antes del tratamiento. Los resultados muestran que las cápsulas de RPE-mIL2 (las fábricas de citocinas) son capaces de erradicar los tumores ID8 establecidos en un modelo de ratón albino con cáncer de ovario de una manera mucho más significativa que la rIL-2⁶.

Se ha comprobado que estas cápsulas, que permiten dosis altas de IL-2 administradas localmente, inducen la activación y proliferación de células T después de una semana de tratamiento. A pesar de originarse a nivel local y desplegar sus efectos a ese nivel, producen también una activación inmunitaria sistémica (la población de células inmunitarias ‘persigue’ al cáncer cuando se disemina por otras partes del cuerpo). De hecho, los ratones tratados con éxito con este tipo de abordaje, y gracias al efecto educador de las células T de memoria, ahora son inmunes frente al mismo tipo de tumor, lo que revela el efecto de entrenamiento inmunitario sistémico.

Se ha generado un modelo para cáncer colorrectal, asumiendo que las células MC38 son un modelo de tumor de adenocarcinoma de colon murino inmunosensible, que demuestra también los efectos antitumorales de la monoterapia *in vivo* de RPE-IL2. Los resultados muestran una respuesta inmunitaria sistémica, de forma que la administración local de cápsulas de AVB-001 produce inmunidad de memoria protectora en todo el sistema frente a las células tumorales.

Además, se ha confirmado el beneficio derivado del control del número de cápsulas con RPE-IL2 que se debe administrar y la generación de efectos localizados en el espacio intersticial, sin acceder directamente al torrente sanguíneo. Al eludirse la presencia de altas concentraciones de IL-2 en el torrente sanguíneo, se evitan efectos adversos.

En primates no humanos, las fábricas de citocinas son bien toleradas e inducen la proliferación de células T CD8+ a nivel local, sin causar la expansión de las células T reguladoras.

Diversos grupos de investigación han acumulado en las últimas dos décadas una experiencia positiva con la administración pleural de IL-2 para tratar el mesotelioma^{7,8}, lo que ha animado a probar este abordaje con las fábricas de citocinas y el sistema de administración de IL-2 de forma local, seguro y clínicamente traducible, para aumentar la potencia de la terapia y minimizar la exposición sistémica a las citocinas⁹.

En concreto, se ha evaluado la eficacia terapéutica de las fábricas de citocinas IL-2 en un modelo de ratón con mesotelioma maligno, que ha logrado concentraciones 150 veces más altas de IL-2 en el compartimento local y con fuga limitada a la circulación sistémica.

La carga tumoral AB1 se redujo en un 80% después de una semana de tratamiento con monoterapia, y 7 de 7 animales exhibieron erradicación del tumor sin recurrencia. Con ello se confirma la seguridad de este tratamiento. Las fábricas de citocinas IL-2 favorecen la erradicación de los tumores de mesotelioma maligno agresivo en un modelo de ratón, la protección contra la recurrencia del tumor y

aumentan la eficacia terapéutica de la terapia con la proteína aPD1⁹.

Estos prometedores resultados experimentales impulsan la transferencia de la tecnología a la clínica, un esfuerzo que está respaldado por el incremento de la financiación para desarrollar estudios clínicos.

Referencias bibliográficas:

1. Vegas AJ, Veisheh O, Gürtler M, Millman JR, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immunocompetent mice. *Nat Med.* 2016;22(3):306-11.
2. Vegas AJ, Veisheh O, Doloff JC, Ma M, et al. Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):345-52.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs H, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
4. Vlad AM, Budiu RA, Lenzner DE, Wang Y, et al. A phase II trial of intraperitoneal interleukin-2 in patients with platinum-resistant or platinum-refractory ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(2):293-301.
5. Minor DR, Moores AP, Chanc JK. Prolonged survival after intraperitoneal interleukin-2 immunotherapy for recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol Rep.* 2017;22:43-4.
6. Nash AM, Jarvis MI, Aghlara-Fotovvat S, Mukherjee S, et al. Clinically translatable cytokine delivery platform for eradication of intraperitoneal tumors. *Sci Adv.* 2022;8(9):eabm1032.
7. Astoul P, Picat-Joossen D, Viallat JR, Boutin C. Intrapleural administration of interleukin-2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a Phase II study. *Cancer.* 1998;83(10):2099-104.
8. Castagneto B, Zai S, Mutti L, Lazzaro A, et al. Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: Results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer.* 2001;31(2-3):303-10.
9. Nash AM, Aghlara-Fotovvat S, Castillio B, Hernandez A, et al. Activation of adaptive and innate immune cells via localized IL2 cytokine factories eradicates mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res.* 2022;28(23):5121-35.

debate

Moderadora:

Erika Pastrana

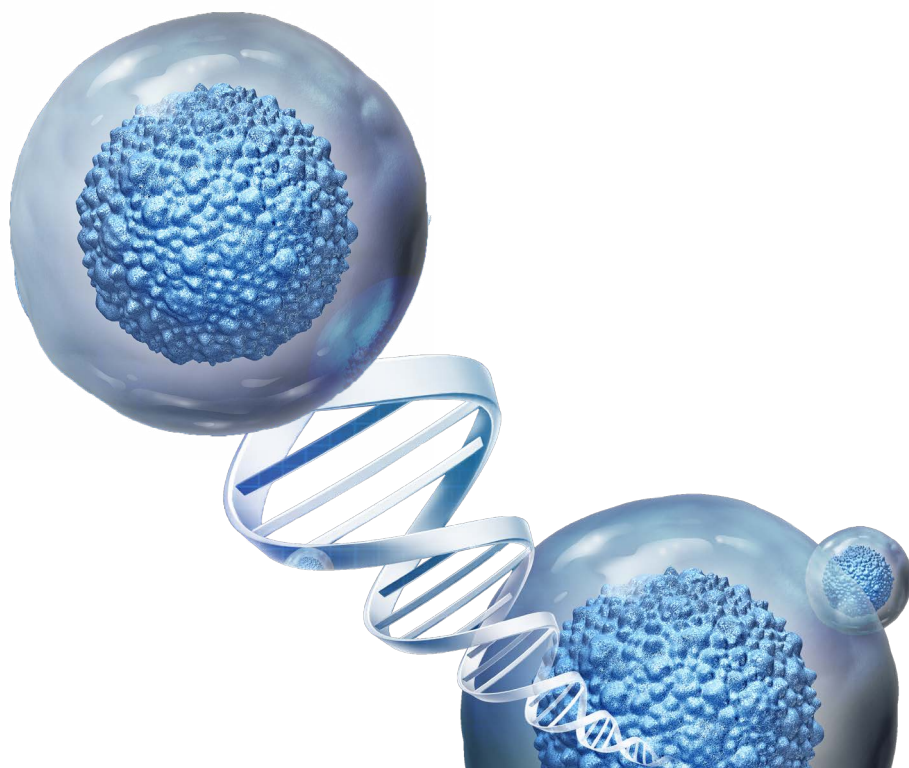
Mesa redonda:

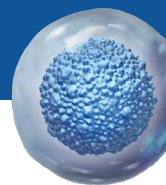
Dr. Luca Biasco

Prof. Evelyn Ullrich

Dra. Elena Garralda

Prof. Omid Veischi





Para finalizar, un **debate** con los ponentes, moderado por **Erika Pastrana**, para profundizar y comentar los diferentes enfoques descritos a lo largo de la sesión y responder las preguntas de los asistentes sobre las terapias celulares.

Prof. Omid Veisheh, usted ha llegado muy lejos en su investigación. ¿Cuál cree que es el siguiente paso a raíz de todo lo que ha aprendido?

Omid Veisheh: Mi motivación personal es mejorar la vida de los pacientes con nuestros enfoques de ingeniería. En mi charla he expuesto una aproximación simple que más o menos funcionaba, pero no se podía adoptar de forma generalizada; ahora es el momento en el que los ingenieros deben intervenir para buscar nuevas soluciones.

Tengo curiosidad sobre la toxicidad, una vez que se produce con la administración habitual, se detienen las dosis y se revierte rápidamente cuando cesa la administración de las dosis. ¿Cómo afrontan ustedes la toxicidad una vez se han inyectado las ‘perlas’ o cápsulas, ya que el paciente, tras un mes, va a seguir teniendo IL-2?

Omid Veisheh: La inmunoterapia siempre ha tenido ese reto, por eso pensamos en algo que funcione en un período más corto (varias semanas hasta un mes). Pero es cierto que, si se inyecta un anticuerpo, se plantea el mismo reto, ya que va a circular durante algunas semanas. Gracias al gran trabajo que los clínicos han hecho, se ha mejorado mucho en el uso de fármacos, como esteroides, con los que se puede rebajar la actividad del sistema inmunitario en caso de ser necesario. Creemos que **no es preciso un control tan estricto como el que se da en los pacientes con inmunoterapia**.

¿Cuál es su opinión sobre los aspectos más prometedores de las terapias de combinación?

Evelyn Ullrich: No es necesario tener un solo enfoque, sino combinar diferentes tecnologías. Creo que la modificación de células inmunitarias y de células madre necesita citocinas, por lo que sería una gran ventaja proporcionar dosis mayores de citocinas en las zonas donde se requieren, también poder dirigir las células inmunitarias allí donde se necesitan y después poder retirarlas.

El gran reto es descubrir qué **enfoque personalizado** es el mejor para cada paciente y su enfermedad. Tenemos muchos conocimientos, necesitamos unirlos y aplicar descubrimientos preclínicos y funcionales, además de enfoques *Next-Generation Sequencing* para las células tumorales.

Elena Garralda: Estoy completamente de acuerdo, las **combinaciones** son el siguiente paso. El problema está en qué combinar y a qué paciente le hace falta cada combinación. La asociación de los inhibidores de *checkpoints* es una opción clara, según lo muestra la clínica, y por su gran potencial al relacionarse con muchos tipos tumorales.

En los tumores inmunogénicos, esta es una combinación que tiene mucho sentido; el problema son los tumores fríos, los que no son tan inmunogénicos. En estos últimos se necesitan otras combinaciones, como potenciadores de las células T que les permitan sentirse ‘atraídas’ por el tumor de forma distinta. La clave

estará en encontrar el mecanismo concreto de ese tumor y su inmunogenicidad.

Omid Veisheh: Las combinaciones van a ser el futuro para el cáncer, ya que es una enfermedad muy compleja y estamos comenzando a descifrar cómo lo percibe el sistema inmunitario y todos los mecanismos que el tumor usa para ‘apagar’ al sistema inmunitario. Será importante poder demostrar que cada uno de los componentes de la combinación terapéutica hace algo único en los pacientes; y resulta improbable que encontremos algo que no funcione bien por sí solo, pero sí sea efectivo combinándolo. Hay que testar la eficacia de la monoterapia en ensayos clínicos y luego combinarla.

Luca Biasco: Trabajo principalmente con enfermedades genéticas, donde no es habitual el empleo de terapias de combinación; sin embargo, estamos tratando de combinar defectos genéticos para modificar las células madre y convertirlas en funcionales. Combinamos la terapia génica *in vivo* con una terapia de anticuerpos que permita que las células modificadas se expandan y que sean eliminadas las que no lo estén, es decir, se usan dos mecanismos a la vez: se modifican células y se deplecionan las que no hayan sido alteradas, proporcionando así un mayor espacio a las células corregidas para que se expandan.

En mi opinión, **el futuro será la terapia génica *in vivo* que marcará la diferencia en la traslación clínica**.

Si el paciente ya es inmunodeficiente (es decir, su sistema inmunitario ya está dañado previamente a la aparición de cáncer), ¿cómo estas inmunoterapias se adaptarán? ¿Hay investigaciones en esta línea?

Elena Garralda: Tenemos poca información sobre estas terapias, que son experimentales. En los ensayos iniciales de los inhibidores de *checkpoints* inmunitarios se excluía a pacientes con inmunodeficiencia primaria, pero ahora que hay una mayor experiencia con aquellos inhibidores que se han aprobado, se está valorando su eficacia en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se está comenzando a recopilar información respecto a ese tema, pero en la mayoría de estas terapias —que se encuentran en fase I-II— no existe mucha información con pacientes inmunodeprimidos.

Omid Veisheh: La inmunoterapia aún es algo muy nuevo, pero es emocionante pensar que muchas de las tecnologías y herramientas que se están desarrollando hoy día podrían usarse también para enfermedades autoinmunitarias y en pacientes con inmunodeficiencias. Sabemos que no podemos vacunar a ciertos pacientes debido al funcionamiento incorrecto de su sistema inmunitario, pero si tenemos la capacidad de producirles anticuerpos; quizás podamos saltarnos el paso de vacunación y producir anticuerpos neutralizantes en el paciente. En este sentido, hemos obtenido recientemente apoyo de la fundación GATES para investigar sobre este tema en sujetos con VIH.

¿Por qué se usan células B para la presentación de antígenos en lugar de otras como las dendríticas?

Elena Garralda: En nuestro equipo, Elena Gors tenía ya experiencia con el

empleo de estas células. Además, las células B son las más fáciles de reproducir en el laboratorio y las que mejor se obtienen de los pacientes.

Se ha mencionado que se pueden generar células CAR-NK a partir de un linaje de células NK. ¿Qué ocurre con ellas tras la infusión? ¿Viven para siempre en el paciente?

Evelyn Ullrich: Se trata de una célula similar a la *natural killer* (NK), llamada NK92, la cual se aisló de un paciente de linfoma de células NK, de modo que existen algunos problemas de seguridad.

En el contexto preclínico, esta célula puede proliferar mediante la adición de IL-2, una citocina clave para estas células NK92. Ahora que se está aplicando en los primeros ensayos en humanos, es necesario irradiar la línea celular antes, haciendo que solo sean funcionales unos días, tras los cuales ya no pueden proliferar y así evitar los problemas de seguridad. Estamos desarrollando ahora un producto con células NK primarias que podemos dejar que proliferen.

Prof. Omid, es una gran herramienta la que usted ha presentado, pero a veces tenemos líneas celulares en el laboratorio que son dependientes de la presencia de alguna citocina u otra molécula biológica. ¿Se han probado para estas funciones *in vitro*?

Omid Veisheh: Sí, funcionan muy bien, por lo que muchos colaboradores nos piden hacerles alguna. Las tenemos criopreservadas como 'bolas' para su distribución, de forma que solo sea necesario echar un par en un gran reactor para producir las citocinas necesarias. También pueden funcionar en ese contexto.

¿Cómo se combinan estas inmunoterapias y terapias celulares con la quimioterapia actual? ¿La sustituirán?

Omid Veisheh: La **quimioterapia** es una forma muy tosca de tratar el cáncer. En algunos casos funciona bien, pero los efectos secundarios son terribles y los pacientes pueden desarrollar resistencias.

La quimioterapia, cuando funciona, lo hace mejor en términos de durabilidad y, aunque hay efectos secundarios, es mejor que no someter al paciente al tratamiento.

Por su parte, las **terapias celulares** suponen un nuevo arsenal para complementar los tratamientos actuales, y espero que con el tiempo los pueda sustituir.

Las **terapias dirigidas** también resultan de utilidad, ya que pueden atacar las mutaciones específicas de las células tumorales. Cuantas más opciones existan para los pacientes, mejor.

Elena Garralda: Estoy de acuerdo. Prescindir de la quimioterapia es difícil, pero debemos investigar cómo la podemos combinar. Se puede usar para potenciar la muerte del tumor, hacerlo más inmunogénico, y potenciarlo con la inhibición de *checkpoints*. La combinación de estas terapias funciona mejor que el uso individualizado de una de ellas, pero depende de cada paciente. No creo que la quimioterapia se elimine, aunque puede quedar relegada a un plano secundario.

Evelyn Ullrich: Todos los subtipos de estas enfermedades los tenemos clasificados según las diferentes variaciones genéticas, y sobre esta base se toma la decisión acerca de qué pacientes requieren mayores dosis y qué tipo de quimioterapia, o si requieren un trasplante de células alogénicas. Por eso, creo que los

protocolos se pueden sustituir por otros que contemplen quimioterapia a dosis bajas y que preparen al paciente para una infusión de células inmunitarias modificadas. Aun así, es peligroso cambiar algo que funciona, ya que, a pesar de los efectos secundarios de la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia es muy alta. Hay que ir paso a paso.

¿Qué opinan sobre la resistencia adquirida a los tratamientos y cuáles son sus perspectivas futuras?

Evelyn Ullrich: Hay muchos factores que intervienen en la generación de resistencia a un tratamiento. Una de las posibilidades es que sea un tumor con composición heterogénea y algunas de las células puedan ser resistentes a la terapia, produciendo una presión selectiva para que se desarrollen resistencias. A veces existen células iniciadoras de tumor aunque este no se ha desarrollado; las características de estas células no están muy definidas, por lo que no se detectan en los análisis y, por ello, el tumor puede crecer tiempo después.

También es posible que el ambiente tumoral contenga factores que rebajen la respuesta inmunitaria de resistencia del tumor frente a la terapia.

Ahora existen herramientas que permiten determinar si debemos cambiar o modificar el tratamiento en esos casos.

Elena Garralda: La resistencia es uno de los mayores retos del tratamiento antitumoral, y no creo que vaya a existir un tratamiento donde no aparezca.

Hay un incremento de probabilidades de encontrar linfocitos que infiltren el tumor en los pacientes tratados con inhibidores de puntos de control (*checkpoints*) inmunitarios, por lo que es posible que haya alguna edición como mecanismo de resistencia.

Sus ponencias son esperanzadoras en cuanto a las tecnologías que están llegando. Se trata de herramientas muy complejas y caras. Realmente, ¿qué impacto cabe esperar de ellas?

Evelyn Ullrich: La traslación clínica de la inmunoterapia es muy larga y supone un reto, sobre todo, porque se trata de un procedimiento caro. Debemos optimizar el tiempo de producción y reducir el coste. Una herramienta a destacar es la **edición no viral de las células inmunitarias**.

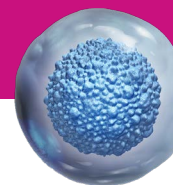
También podemos mejorar el resultado y la persistencia de las células inmunitarias con la **aplicación de citocinas *in vivo***.

Luca Biasco: La principal evolución en la terapia génica de células madre es el enfoque *in vivo*. Este campo ha evolucionado extraordinariamente en los últimos 2 años y ahora podemos alcanzar las dianas *in vivo*.

El enfoque *ex vivo* funciona muy bien, pero resulta muy caro, así que el mayor reto de la terapia génica es reducir el coste: se trata de los fármacos más caros del mercado, pero funcionan. La reducción en el coste se puede lograr mediante nuevos enfoques, como el abordaje *in vivo*, o tratando de reducir los costes preclínicos.

Elena Garralda: El alto coste de las terapias es un reto en el abordaje del cáncer. **Necesitamos que el acceso a estos fármacos sea sostenible.**

Omid Veisheh: Estamos, en nuestro caso, en el momento de industrializar el proceso, lo que implica prestar atención a su coste para tratar de hacer las terapias más accesibles.



Presentation

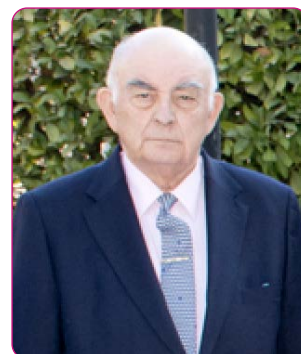
Cell therapies have been the topic of the **Conference-debate** of the **Fundación Ramón Areces-Springer Nature**, which has recovered its face-to-face format and captured the massive interest of health professionals, researchers, and above all, young students and researchers, interested in knowing the new opportunities that arise from genetic engineering and immunotherapy. And all this will be led by prominent and internationally renowned experts: **Luca Biasco, Evelyn Ullrich, Elena Garralda** and **Omid Veisheh**. Each of them, from their particular research field and academic, scientific and clinical interest, has shared their experiences and presented their studies, viewpoints, concerns and hopes in this meeting.

As highlighted in this scientific session, the clinical implementation of cell therapies has experienced an extraordinary growth in recent years. And thanks to new genetic engineering techniques, cell therapies are positioned as a leading treatment for the cure of certain types of cancer, as well as some neurological and autoimmune diseases. Specifically, this **15th Conference** has delved into the **current clinical applications of cell therapy** for the treatment of cancer and has shown advances in the knowledge of the immune system, advances that have allowed the design of safer strategies and the implementation of more effective genomic modification techniques. The meeting also served to discuss and reflect on the future perspectives that this technology offers to deal with diseases that, until now, were considered incurable. The constant progress documented in relation to cell therapies is postulated as a solid pillar on which many **future treatments** against diseases such as cancer will be based.

This **15th edition of the Cycle of Conferences and Debates in Sciences**, jointly organized by the **Fundación Ramón Areces** and **Springer Nature**, focuses on cell therapies and the enormous opportunities that are glimpsed in this area thanks to the progress made in genetic engineering and immunotherapy.

In previous editions, these conferences had addressed other topics of scientific interest, such as genetic testing, the medical contributions of nanotechnology, personalized medicine, autoimmune diseases, emerging infectious diseases, advances in type 2 diabetes mellitus, challenges and advances in regenerative medicine, neurodegenerative diseases and, last year, atmospheric CO₂ capture techniques.

On this occasion, both the **Fundación Ramón Areces** and **Springer Nature** have considered the need to address the topic of cell therapies for several reasons, all of them of special relevance. Cell therapies based on the administration of modified cells to fight a disease have become a resource that has experienced enormous growth in its clinical application in recent years. There are many examples of success already known, such as the use of genetically altered cells (such as CAR-T) to attack various types of tumours, or stem cells to treat, for example, the damaged cornea. Precisely, the main objective of this conference has been to have the most outstanding clinical scientific approach to **show some successful experiences with therapies based on modified cells for the treatment of lymphomas and solid cancers**. We sincerely believe that, thanks to the collaboration of **Springer Nature**, we have achieved it.



José María Medina

Council of Life and Matter Sciences
Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain

After 2 years of having an online format, the **15th Conference-debate in Sciences** of the **Fundación Ramón Areces** and the **Springer Nature** group recovers its face-to-face format. In our presentation last year, when for the second consecutive year the pandemic forced us to continue with the online format, we were eager to see the auditorium full of science enthusiasts again. We are pleased that, thanks to the advances in biotechnology applied to vaccines (amongst other factors), we have almost overcome the COVID-19 pandemic and can enjoy this day again in its traditional format.

This year the **progress made in the field of cell therapies is addressed, with speakers showing the latest advances in immunotherapy and genetic engineering**. Those of you who have attended these conferences over the years will recognize our passion for deepening our knowledge of our own cells to treat diseases, such as when almost a decade ago we reviewed advances in regenerative medicine or, more recently, we approached the study of organoids as potential new treatment routes.

Nowadays, the advances in cell therapy and gene therapy run in parallel. Although for decades gene therapy had not reached sufficient efficiency and safety to suggest a clear clinical benefit, improvements in the techniques of genetic modification of our immune system cells have allowed progress in its use to treat haematological cancers and solid tumours.

At **Springer Nature** we are committed to disseminating and bringing the latest scientific advances to the general public, as well as fostering and being a vehicle for dialogue between academic scientists, the private industry and society. Therefore, throughout this year we have published a series of collections focused on genetic engineering, both of viral vectors and immune cells, within the 'Collections' series of the Nature journals. These publications combined not only the study from basic science, but also their applicability in biotechnology and pharmaceutical companies, all to facilitate the introduction of these new therapies in routine clinical practice.

One more year, we thank the **Fundación Ramón Areces** for the opportunity to collaborate in these conferences. We thank its Scientific Committee, represented by professors **Emilio Bouza** and **José María Medina**, for their commitment to the advancement of science and medicine that brings us, every year, extremely interesting topics. We also thank the General Director of the Foundation, **Mr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra**, and **Mr. Manuel Azcona**, Director of Communication, for the trust placed in us to continue organizing these days that we enjoy so much.

And last, but not least, I would like to thank the speakers **Luca Biasco**, **Evelyn Ullrich**, **Elena Garralda** and **Omid Veischi** who have travelled to Madrid to share with us these conferences and their vision of cell therapies. I would also like to highlight the work of **Erika Pastrana**, Editorial Director of Nature magazines in this event; without a doubt, it is an honour to have your good work and passion for science.

Soledad Santos

Editorial Director of Iberia and Latin-America
Springer Healthcare, a Springer Nature business



introduction



Erika Pastrana

Editorial Director of Nature Journals
New York, USA

Erika Pastrana has a degree in Biochemistry and Molecular Biology from 'Universidad Autónoma de Madrid' and was granted a doctorate at the same university, investigating the cellular and molecular mechanisms responsible for promoting the regeneration of damaged axons in the mammalian central nervous system. After her doctoral thesis, Erika went to New York for four years where she did her postdoctoral studies at Columbia University studying neurogenesis and neural lineage progression mechanisms in adult mice.

She began her publishing career in 2010 as editor at *Nature Methods*, where she was in charge of neurosciences, and in March 2014 she moved to the *Nature Communications* journal as Team Manager. In April 2017 she began as Executive Editor in the Division of *Nature Research Journals* and, in 2019, as Editorial Director of *Nature Journals*, being responsible for the management and editorial direction of applied sciences and chemistry, including *Nature Biotechnology*, *Nature Medicine*, *Nature Biomedical Engineering* – among others – and, more recently, *Nature Electronics*, *Nature Mental Health* and *Nature Machine Intelligence*.

Erika is part of the *Nature Research* management team and is responsible for the development and implementation of new editorial policies, practices and workflows.



Introduction

This is the seventh time I have had the honour of serving as moderator of such an important event. In this new edition of the **Conference-debate in Sciences**, organized jointly by the **Fundación Ramón Areces** and the **Springer Nature** group, we have four world experts in the field of cell therapies, who summarize their latest discoveries and present their viewpoints.

Cell therapies, based on the administration of cells to fight a disease, have experienced an extraordinary growth in their clinical application in recent years. The first applications of cell therapy in humans began in 1950 and consisted of bone marrow transplantation to treat patients with haematological cancers.

The success of these treatments provided years of evidence of **the potential of cells as agents to treat diseases**.

With the approval of the use of CAR-T cells (chimeric antigen receptor T cells), genetically altered to attack leukaemias and lymphomas, and their success in treating solid and liquid cancers, this field has experienced an unprecedented explosion and it is allowing us to reach the milestone of turning cancer into a curable disease.

These conferences synthesize recent advances in the use of genetically altered haematopoietic cells to treat genetic diseases. Clinical progress in immunotherapy is also discussed in detail. It stands out how **the use of biomaterials and genetic engineering** applied to cell therapies raise new personalized therapeutic prospects.

lectures

- **NOVEL CELLULAR TARGETS AND DELIVERY STRATEGIES FOR HAEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELL GENE THERAPY**

Dr. Luca Biasco

Sana Biotechnology, Cambridge, Massachusetts, USA, and University College London, London, UK

- **IMMUNOTHERAPY WITH GENETICALLY ENGINEERED IMMUNE CELLS – A RECENT PERSPECTIVE**

Prof. Evelyn Ullrich

Experimental Immunology, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany

- **ADVANCES IN TUMOUR-INFILTRATING LYMPHOCYTE THERAPY FOR SOLID TUMOURS**

Dr. Elena Garralda

Director and Principal Investigator of the Early Drug Development Unit, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain

- **DEVELOPMENT OF CELL-BASED CYTOKINE FACTORIES FOR IMMUNOMODULATION**

Prof. Omid Veischi

Department of Bioengineering, Rice University, Houston, Texas, USA



Novel cellular targets and delivery strategies for haematopoietic stem and progenitor cell gene therapy

Dr. Luca Biasco

Sana Biotechnology, Cambridge, Massachusetts, USA, and University College London, London, UK

Luca Biasco is currently the executive director of the R+D program of the gene therapy company Sana Biotechnology, based in Cambridge, Massachusetts (USA). In addition, he is a professor at London University College within the Gene Therapy Programme of the Institute of Child Health at Great Ormond Street Hospital.

Dr. Luca Biasco was part of the scientific group that developed the first commercially approved *ex vivo* stem cell gene therapy in the world (Strimvelis™, distributed by GSK). He was also a consultant to GSK on the study about the safety of lentivirus gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome.

At Boston Children's Hospital/Dana Farber Cancer Institute, he was responsible for the vector safety team for the Gene Therapy program. In addition, at Harvard Medical School, he led a research laboratory focused on the properties of stem cell gene therapies and their *in vivo* behaviour upon infusion in humans.

In his presentation, Dr. Biasco details the advances in the use of haematopoietic stem cells (HSCs) thanks to gene therapy and presents the latest *in vivo* administration techniques.

As he explained, **adult haematopoiesis in humans is organized hierarchically**. At the top we have the **HSCs**, which are located in the bone marrow and, next to them, the **multipotent progenitors**; both types of cells can survive for a long time and generate all blood cells. Below are the **erythroid, lymphoid and myeloid progenitors**, which generate cells of a specific branch of haematopoiesis.

Genetic defects that affect specific differentiation branches result in failures in the reproduction of certain blood cell groups (neutrophils, monocytes, lymphocytes, etc.).

This way, it is proposed that gene therapy directed to the CD34+ compartment, which includes HSPCs, could change the course marked by genetic defects.



Dr. Luca Biasco

The most common approach to carry out this therapy is to isolate the patient's CD34+ cells to add a lenti/retroviral vector with a genetic payload, so the correct genetic copy of the mutated gene is included. Then, CD34+ cells are expanded *in vitro* into a selective medium containing cytokines to boost transduction. Finally, the transduced CD34+ cells are reinfused into the patient. Before this reinfusion, the patient is given low doses of chemotherapy to facilitate the proliferation of the modified cells.

The most frequently used vectors in this type of therapy are lenti/retroviral, because:

- 1) they have a lipid bilayer that allows fusion with CD34+ cells (VSV-G is the most used vector);
- 2) they permanently integrate therapeutic genes in the host genome by delivering a provirus and an integrase complex into the nucleus of host cells, which causes both the treated cells and their descendants to have the integrated therapeutic gene; and

- 3) the integration of vector genetic information into the genome is done safely and semi-randomly since the vector can choose anywhere to deliver the genetic material.

How could we use this semi-random distribution to track the destination of the modified cells?

Each cell will have a unique insertion site completely different from the other insertion sites of the other modified cells, and it will be the same for their descendants. Each of these cells has a stable 'barcode'.

After the patient has been infused with the modified cells and is followed over time, peripheral blood samples containing stem-cell-derived cells can be collected using a **technique** called 'insertion site analysis'. This process can be monitored in the patient over time and determine how many insertion sites are shared by the different cell populations. The abundance (number of cells that have exactly the same binding site when derived from the same HSC) and the diversity of the insertion site can be used to track the status of a particular population over time.

Current research is interested in the evolution of the cell population in patients undergoing gene therapy.

Ex vivo gene therapy based on genetic engineering of HSPCs

Ex vivo HSPC gene therapy has been proposed to treat primary immunodeficiencies. There are patients who are born with a genetic defect, a mutation in the interleukin receptor 2 γ chain (SCID-X1, severe combined immunodeficiency-X1), which causes the absence of lymphoid lineages, which makes the patient unable to produce T lymphocytes, B lymphocytes and natural killer (NK) cells.

It was hoped that by reinfusing modified cells to patients with this genetic defect, the absent lineage could be recovered, in addition to strengthening the rest of the haematopoietic progenitors (Figure 1).

Over two decades, 10 patients treated with a γ -retroviral vector to transduce CD34+ cells *ex vivo* were followed up. The infusion was administered at the age of 8 months on average, and a mean of 23.9×10^6 cells/kg were infused. No conditioning was performed on patients prior to treatment. All of them remain alive and well to date. One patient

developed acute lymphoid leukaemia 24 months after gene therapy, but after 2.5 years of chemotherapy he went into clinical and molecular remission, and in the last follow-up was still in this state. **This is one of the first trials on gene therapy in HSC with a very long-term follow-up.**

In patients' peripheral blood, only T and NK cells with the therapeutic gene were produced due to the persistence of memory lymphocytes in the peripheral blood, which can survive decades after gene therapy. However, they were not produced in monocytes, B lymphocytes, neutrophils, or any other type of blood cell. This may be because long-term surviving multipotent progenitors were lost. If this hypothesis were correct, only memory T cells should be detected in blood; that is, no inactivated/*naïve* T cells (TN), since these are of recent production in the thymus and have a short life. Stem cells are needed for these lymphocytes to be produced. When studying patients' cell population, it could be seen that there were TN cells containing the therapeutic gene. These could not come from the modified stem cells since they did not last in the bone marrow, so it was postulated that there were long-survival lymphoid progenitors that were able to continue producing TN cells.

To corroborate that the TN cells were functional, they were isolated and treated; then, the production of interferon γ (IFN- γ) was determined. As they are not memory cell populations, they should not produce IFN- γ after stimulation. The results confirmed that TN cells obtained from patients did not produce significant levels of IFN- γ , while other memory cell subtypes did generate a response.

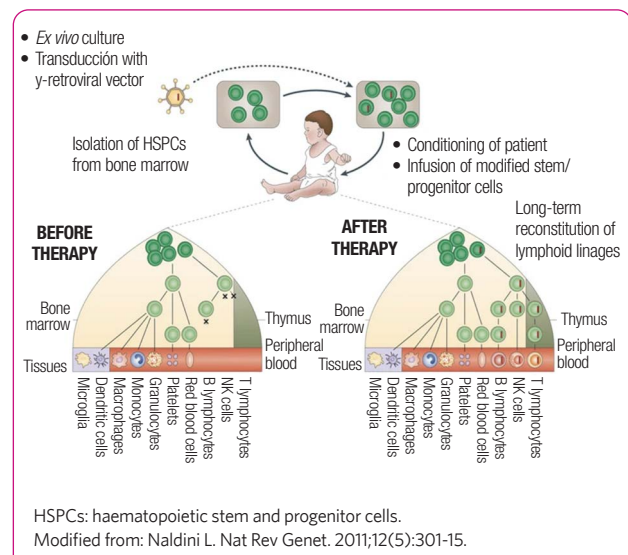


FIGURE 1. *Ex vivo* haematopoietic stem and progenitor cell gene therapy for primary immunodeficiencies.

The rearrangement of the thymus T-cell receptor (TCR) was also studied, and it was noted that there was a high variety and diversity of TCR rearrangement in the compartment of TN cells in different patients and different time points: *TN cells were being produced continuously in the thymus*, thus forming new TCR rearrangements.

These TN cells had the insertion, and the insertion site could be tracked (their diversity, whether there was clonal expansion, types of TN cell insertion sites that were shared with other cell subtypes and data on identical insertion in the TN cells over time). The results of these analyses suggested that there were 2,000–6,000 long-term surviving lymphoid progenitors that continued producing these cells.

Lastly, identical insertion sites between T cells and NK cells were compared. The results were 40% similar, so it was possible that the long-term surviving lymphoid progenitors had bipotent potential to produce both T- and NK-cell subtypes. These progenitors were independent of a stem cell supply.

The results of this first study suggest that there is a population of long-term surviving lymphoid progenitors (at least 15 years), capable of generating T cells and, partially, NK cells.

There are reasons to think that this cell population resides in the thymus and not in the bone marrow; however, there are still no markers to identify and isolate these cells and to understand their origin and function.

Experience at Sana Biotechnology

Sana Biotechnology is developing a new strategy to achieve *in vivo* distribution of gene therapy.

Ex vivo therapy works well, but involves great costs, an autologous transplantation and conditioning of the patient at the level of the bone marrow through chemotherapy. This is not the best scenario as high treatment-related toxicity may occur.

If the vector could be infused directly, intravenously, so it reaches the bone marrow, a much cheaper drug would be obtained, without the need for prior conditioning of the patient, and this would improve the access of patients to this treatment.

For the preclinical development of this type of drugs there are limited options: to isolate the stem cells from an individual and test them *in vitro* or transplant them to permissive

animal models (mice). In our research, both approaches are being used to answer key questions:

Is it possible to genetically modify human naïve HSPCs and human HSPCs *in vivo* with high efficiency and high specificity?

To transduce stem cells, it is necessary to stimulate them with cytokines, which cannot be done *in vivo* because the cells are in their niche; a way must be found to reach them without activation. To do this, various compounds were tested and compared. Two of these were a lentiviral vector (VSV-G), which requires activation for binding to CD34+ cells, and a vector derived from a virus affecting baboons (BaEVTR), which is capable of effectively transducing resting cells. When these two viral vectors were used in non-activated cells, it was appreciated that the baboon virus worked better than the lentiviral version of the vector.

BaEVTR can enter various cell subtypes, and can isolate HSCs and multipotent progenitors specifically, transduce them without activating them and obtain a good level of transcription, even with low doses of the vector.

Another interesting feature is that this vector appears to be less likely to transduce primary human hepatocytes.

The BaEVTR vector seems to be a suitable candidate for *in vivo* modification of human HSPC cells.

The way to check if HSPC can be obtained when they are in the bone marrow is to use humanized mice (Figure 2).

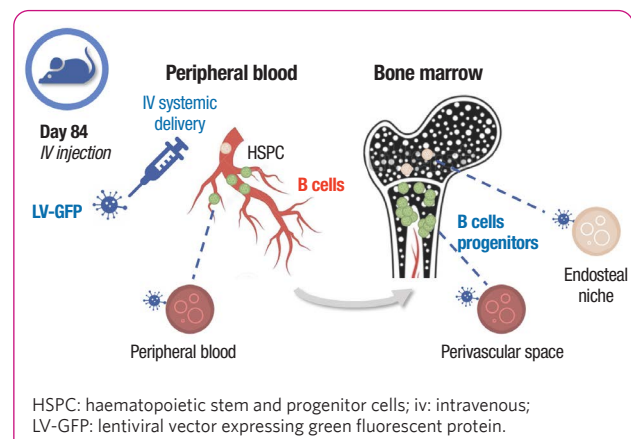


FIGURE 2. Intravenous injection of CD34+ cells into long-term humanized mice to obtain haematopoietic stem cells in bone marrow.

CD34+ cells are injected into the mouse and 12 weeks later the vector is infused and 12 days later it is sacrificed to see which cell type has been transduced. Human cells change their nature when they stay in a mouse for so long, becoming the dominant population of pre-BNK cells, causing many B cells to be found in the peripheral blood; therefore, this is not normal human haematopoiesis, with a very small number of HSPCs. All these factors cause the vector to be infused into an environment with many B cells and many B-cell progenitors, hoping to reach some stem cells. With the use of BaEVTR, good levels of *in vivo* transduction have been already achieved: up to 8% of human cells in peripheral blood, which corresponds to 2% of CD34+ lineage-negative cells, being a small fraction of the cells in the bone marrow that we want to reach. It was also compared with the VSV-G vector and it was seen that it had a very low performance.

Can we avoid modifying cell types other than our target?

Sana Biotechnology is developing **fusogens**, which are incorporated into the vector membrane. These fusogens contain binding sites designed to recognize a specific

receptor present on the surface of the HSC. After binding, a change in the fusion monomer associated with this complex is triggered, which would promote the fusion between the cell membrane and the viral membrane, achieving the insertion of genetic material into the target cells.

Our analytical platform allows us to evaluate the access and on/off transduction potential of fusogens.

An example is the HSC-targeted B fusogen, which should only transduce cells that present the B receptor. There are not many cells of this type in the mouse (0.6%) and they are only located in the bone marrow, so the vector must go from the peripheral blood to the bone marrow and bind only to these cells specifically. When HSC-targeted B fusogen was used, the results suggested a clear enrichment of this particular cell population and showed remarkable *in vivo* specificity.

Preclinical results seem to indicate that it is possible to achieve *in vivo* gene therapy. The aim is to improve and optimize the results using fusogens for human application and for other vectors to be developed.

Recommended bibliography:

Aiuti, A, Biasco L., Scaramuzza S, Ferrua, F, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013;341:6148; Biasco L, Izotova N, Rivat C, Ghorashian S, et al. Clonal expansion of T memory stem cells determines early anti-leukemic responses and long-term CAR T cell persistence in patients. *Nature Cancer*. 2021;2(6):629-42; Biasco L, Pellin D, Scala S, Dionisio F, et al. *In vivo* tracking of human haematopoiesis reveals patterns of clonal dynamics during early and steady-state reconstitution phases. *Cell Stem Cell*. 2016;19(1):107-19; Biasco L, Scala S, Basso L, Dionisio F, et al. *In vivo* tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(273):273ra13; Izotova N, Rivat C, Baricordi C, Blanco E, et al. Long-term lymphoid progenitors independently sustain *naïve* T and NK cell production in humans. *Nat Commun*. 2021;12(1):1622; Naldini L. *Ex vivo* gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*. 2011;12(5):301-15; Pellin D, Loperfido M, Baricordi C, Wolock SL, et al. A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors. *Nat Commun*. 2019;10(1):2395.



Immunotherapy with genetically engineered immune cells – a recent perspective

Prof. Evelyn Ullrich

Experimental Immunology, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany

Evelyn Ullrich is Professor of Cellular Immunology at Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main, Germany. She leads the Experimental Immunology Research Unit and the Cancer Survivorship Unit at Goethe University Hospital Frankfurt. She graduated in medicine at the Albert Ludwig University of Freiburg and received further training at Regensburg, Erlangen and Paris universities. She is a specialist in Internal Medicine and Immunology.

Since 2012, she has led the Experimental Immunology Unit at the Frankfurt Children's Hospital, with the support of the LOEWE Center for Cell and Gene Therapy in Frankfurt. She has participated in the characterization of natural killer (NK) and innate lymphoid cell subsets.

Her group current research focuses on deciphering immune regulation and developing immunotherapies focused on the use of genetic engineering in immune cells (ICs) for clinical implementation.

In her presentation, **Dr. Evelyn Ullrich highlighted the uses of genetic engineering to improve cellular immunotherapy.**

IC research began 60 years ago, and in the last 10 years a series of surprising achievements have been reached, making it possible to modify these cells through genetic engineering. T cells were discovered by microscopic description of thymic tissues in 1961. NK cells were described in 1975 – and, since then, the development of adaptive therapy has been remarkable. This approach allows immuno-suppressed or cancer patients to be treated using IC, such as T or NK cells. These are activated by cytokines and can be modified to target cancer cells.

One of the major advances in cell therapy was chimeric antigen receptor (CAR-T)-based immune therapy for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia¹.



Prof. Evelyn Ullrich

CAR-T cells: a milestone in cellular immunotherapy

In the historical evolution of cell-based immunotherapy, the role recently given to the **chimeric antigen receptor (CAR)** stands out: it is a type of fusion molecule targeting molecules found on the surface of tumour cells.

This construct is composed of activation and signalling domains to activate the ICs once they meet the molecules expressed by the tumour cells to be destroyed. From the discovery of these molecules to their development for clinical use, a long period of time has elapsed in which many research groups have been involved.

Currently, the goal is to modify enough CAR so they can be applied to a large number of patients.

This type of approach is approved by the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency^{2,3}. The first CAR-T cell therapy, tisagenlecleucel, was approved in 2017, and a limited selection of CAR-T products is now available.

The treatment strategy using CAR immune cells requires blood from the patient or donor in order to isolate T or NK cells. Then the gene that encodes the CARs is inserted. It is very important that the gene is safe and has stable expression. This cell must produce a viable population to be administered to the patient, and that proliferates so that it remains active and able to recognise tumour cells. It is a long procedure, but very effective. There is a growing repertoire of constructs that can be used to transduce these cells with CAR, with several generations that differ in their cell-stimulating domains (Figure 1)⁴.

Currently, there are ongoing trials of CAR-T cells worldwide (>1,000), and both trials and publications on this topic are increasing. Most of the studies are phase I–II, the results of which provide a lot of knowledge. It is essential that information is collected on patients who have been treated with CAR-T products; however, we are still at the time of information collection, where most studies are

done in a single centre, so it will take some time to understand the effects of these drugs.

In many cases, autologous cells are used – cells that come from the patient and that have been pre-treated before the extraction of T cells. There are very few studies in which cells from another person are used. Although clinical trials focus on a single target, it is possible to address multiple ones⁵.

Advances and limitations

CAR-T cell therapy is having significant success in the haematology field, as it works with targets that are expressed by most cancer/leukaemic cells.

Solid tumours present a greater challenge due to the high heterogeneity of antigenic expression, in addition to the microenvironment that surrounds them and their limited access. Solid tumour cells can also regulate a reduction in the expression of certain tumour antigens and, if the antigen chosen for therapy is also present in healthy tissues, the risk for these modified cells to attack this healthy tissue is high⁵.

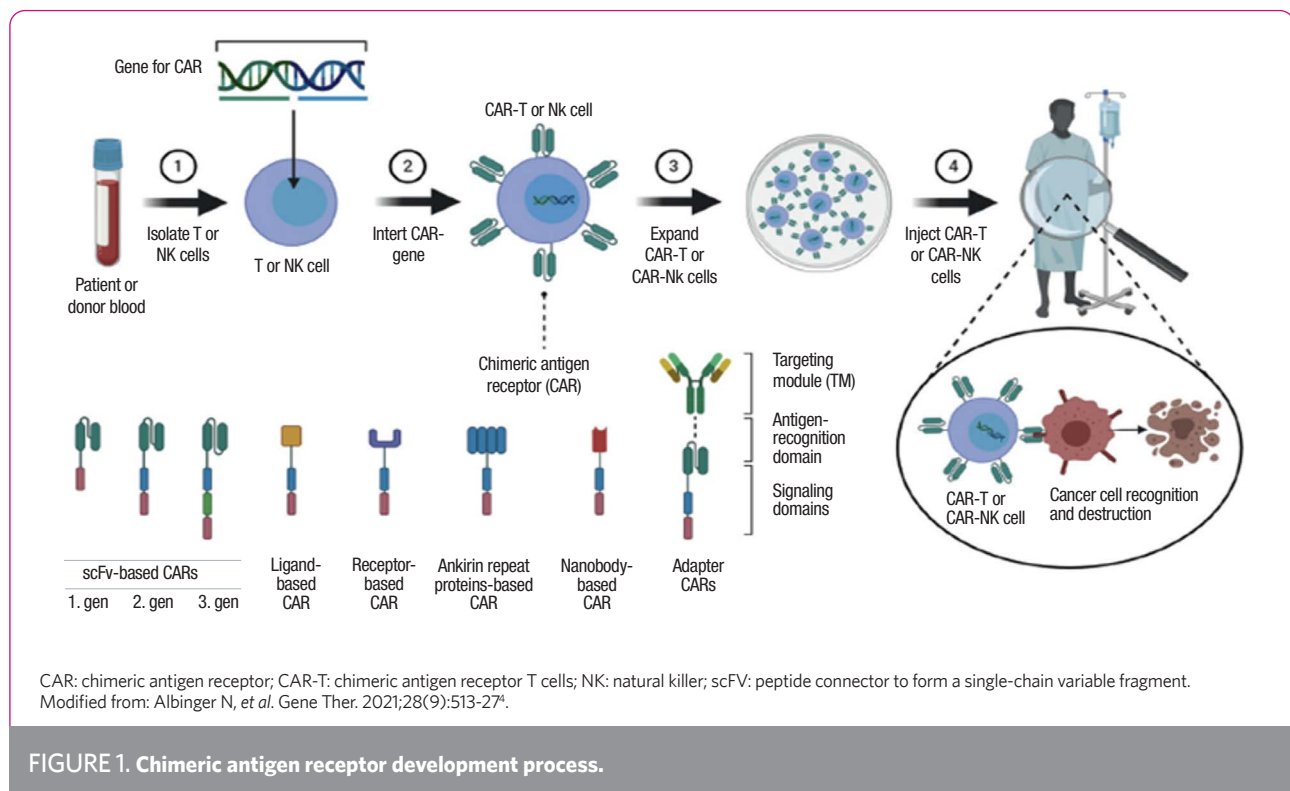


FIGURE 1. Chimeric antigen receptor development process.

Although this therapy is effective and safe, side effects from the use of CAR-T cells have been reported; however, they are easy to control. These effects include cytokine release syndrome, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome and graft-versus-host syndrome (in the case of using allogeneic cells to generate CAR-T)⁶.

Modification of natural killer cells

In our laboratory, new research is ongoing in which NK cells instead of T cells are being modified by genetic engineering.

Both cell types can attack cancer cells and generate a cytotoxic response against them; however, T cells are associated with a T-cell receptor that requires antigenic presentation, while NK cells have a wide repertoire of inhibitory and activating signals to distinguish between healthy and malignant cells. In both T cells and NK cells it is possible to introduce a CAR to specifically target the antigens of interest. For NK cells, the presence of multiple inhibitory and activating receptors in addition to CARs may be of benefit, so if antigen loss occurs, NK cells can mediate a natural cytotoxic response.

Another point in favour of the use of these cells is that there are already previous studies that have proved that they do not cause graft-versus-host disease, in addition to presenting a favourable cytokine profile and having a low risk of neurotoxicity⁷.

The fact that NK cells present inhibitory and activating signals implies that, while they are in a resting state, they do not attack; however, their ability to kill can be induced by binding receptors to molecules that activate them or by intervening in inhibition signals⁷.

At present, there are few trials with this cell type worldwide and many of them are still in the patient recruitment stage. There is an American study in which CAR-NK was used in CD19+ lymphoid tumours, without side effects of interest, and the response of patients met the objective in 73% of cases. However, this is a small study with only 11 patients⁸.

Currently, trials are being conducted to test the response of NK against different targets, such as CD19, CD70, NKG2D and solid tumours, in addition to other studies in which the performance of non-primary NK is being assessed.

Among the main challenges posed in CAR-NK cell-based immunotherapy, and with a promising future, are:

- the application of viral and non-viral technologies for the generation of CAR-NK cells, and
- overcoming immune suppression through genetic engineering.

Other challenges related to NK cells that remain to be addressed are: their alloreactivity/donor selection, their activation (cytokines), and their migration and proliferation.

Pseudotyping was an approach for the transduction of viral products in CAR-NK that presented a problem at first; it is now known that retroviral transduction (RD114-TR) works better than lentiviral (VSV-G), allowing better insertion of vectors into NK cells⁹. However, there are also **non-viral genetic engineering strategies to genetically modify NK cells** that may be cheaper, although many are unstable.

Some of the non-viral technologies that are stable involve the use of 'ancient' DNA that uses a **technology called 'sleeping beauty'**¹⁰.

Zoltán Ivics, the inventor of this technology, in collaboration with Halvard Bönig of Frankfurt, has developed a platform for the creation of non-viral CARs. This technology is being evaluated in the multicentre study CARAMBA¹¹.

Our team has adapted this technology for its use in CAR-NK cells. To achieve this, mice induced with luminescence of leukaemic cells (transduced with luciferase) were used. Thus, it is possible to monitor the progress of mice by bioluminescence while they are still alive. When treated with modified NK cells, the tumour progressed much more slowly¹¹.

The advantages of the non-viral CAR engineering-based strategy are its lower cost and to provide a safer integration profile in NK cells.

'Sleeping-beauty' genes in T cells have been reported to be integrated into genetically safe harbours, something that also happens with NK cells¹².

Acute myeloid leukaemia

Of particular interest are the results obtained in acute myeloid leukaemia, which is more difficult to treat than B-cell leukaemia because the markers present are also found in haematopoietic stem cells.

CD33-targeted CAR-modified NK cells were tested, by transduction of primary blood-derived NK cells,

using baboon-envelope pseudotyped lentiviral vectors (BaEV-LV). Transduced cells showed stable CAR expression, unimpeded proliferation, and increased cytotoxic activity against primary CD33 and AML-positive OCI-AML2 cells *in vitro*. In turn, CD33-CAR-NK cells significantly reduced leukaemic load and prevented leukaemia cell grafting into the bone marrow in mouse models with OCI-AML2 xenograft and no observable side effects. In addition to the increased *in vitro* cytotoxicity of the transduced cells, good results and regression in the progression of leukaemia were observed after treating mice with a single dose of CAR-NK^{4,13}.

In collaboration with the company Miltenyi Biotec, our research group is working on producing a greater number of anti-CD33 CAR-NK cells, with the aim of producing them in Frankfurt and using them in a greater number of mice with induced multiple myeloma. It was noticed that the mice experienced a relapse into leukaemia, which could be due to a checkpoint (NKG2A) that inhibits CAR-NK cells. This receptor can be removed/silenced by using CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9-based gene editing from the NKG2A immune checkpoint improves NK cell-mediated cytotoxicity against multiple myeloma, with evidence of improved CD33-CAR-NK functionality. The cells responsible for multiple myeloma are attacked by the cells transduced by an annexin marker, which can only be observed when the

cells are eliminated by cytotoxicity¹⁴. It has also been tested in a mouse model, confirming that doubly modified cells are more effective.

An important finding was that the leukaemia reappeared, but not in the bone marrow, so a bone marrow transplant was performed to see if the leukaemic stem cells had been attacked; only those transplanted with CAR-KO cells achieved 100% survival.

Conclusions and future perspectives

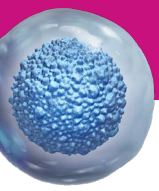
Immune cell modification can be very beneficial for cancer patients, especially those with difficult-to-treat tumours. In addition to T cells, other cell types can be modified, which allows choosing the most useful for each tumour entity.

CAR-NK cells can be generated from external donors and their efficacy can be improved by specific deactivation of some immunosuppressive pathways and CiteSeq (RNA/Ab-Seq) analyses can help to clarify the underlying mechanisms.

The next generation of CAR-NK will offer important improvements, such as the development of products based on non-viral technology; integration of cytokines, chemokines and the integration of the safety switch; development of different CARs for malignancies; and the possibility of using innovative combined approaches.

References:

1. Wendel P, Reindl LM, Bexte T, Künemeyer L, et al. Arming Immune Cells for Battle: A Brief Journey through the Advancements of T and NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1481.
2. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
3. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2011;3(95):95ra73.
4. Albinger N, Hartmann J, Ullrich E. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Ther*. 2021;28(9):513-27.
5. Barros LRC, Couto SCE, Da Silva D, Paixão EA, et al. Systematic Review of available CAR-T Cell Trials around the world. *Cancers (Basel)*. 2022;14(11):2667.
6. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(2):85-96.
7. Reindl LM, Albinger N, Bexte T, Müller S, et al. Immunotherapy with NK cells: Recent developments in gene modification open up new avenues. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1777651.
8. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*. 2020;382(6):545-53.
9. Müller L, Tunger A, Plesca I, Wehner R, et al. Bidirectional crosstalk between cancer stem cells and immune cell subsets. *Front Immunol*. 2020;11:140.
10. Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, et al. CARAMBA: A first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Ther*. 2021;28(9):560-71.
11. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. 1997;91(4):501-10.
12. Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, Schleef M, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral sleeping beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia*. 2017;31(1):186-94.
13. Albinger N, Pfeifer R, Nitsche M, Mertlitz S, et al. Primary CD33-targeting CAR-NK cells for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2022;12(4):61.
14. Bexte T, Alzubi J, Reindl LM, Wendel P, et al. CRISPR-Cas9 based gene editing of the immune checkpoint NKG2A enhances NK cell mediated cytotoxicity against multiple myeloma. *Oncoimmunology*. 2022;11(1):2081415.



Advances in tumour-infiltrating lymphocyte therapy for solid tumours

Dr. Elena Garralda

Director and Principal Investigator of the Early Drug Development Unit, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain

Elena Garralda has been a clinical researcher and director of the Early Clinical Drug Development Unit at the Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona (Spain), since 2017.

Her career has focused primarily on proof-of-concept and proof-of-mechanism trials with targeted therapies, with special emphasis on cell signalling, cancer stem cells and immuno-oncology, as well as cell therapy for solid tumours.

She is currently working on First-In-Human targeted therapies studies, efficient combinations of targeted therapies, biomarker-based clinical trials, and studies in molecularly selected populations. One of the objectives of Dr. Garralda's group is to link her clinical research with the different research areas of the Institute and to develop better cancer therapies adapted to the specific and individual characteristics of each tumour.

In her presentation, **Dr. Garralda discussed advances in immunotherapy to treat solid tumours.**

This progress is being made thanks to the ability of the immune system to fight cancer, and through a pioneering technique based on solid tumour infiltrating lymphocytes (TIL).

In essence, it is about penetrating the tumour with lymphocytes (immune cells that are mostly in the blood), that have been previously manipulated and reactivated in the laboratory, so they learn to recognize and destroy tumour cells.

The therapeutic gap

For any tumour to exist, grow and remain over time it must be able to avoid the immune system. With the discovery of the immune checkpoint inhibition processes, and the identification of two inhibitors of immune control (programmed cell death protein 1 [PD-1] and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 [CTLA-4]), a revolution in Oncology began which facilitated the development



Dr. Elena Garralda

of many therapies aimed at acting specifically against these targets.

The main clinical outcome of these advances was the **increased survival of cancer patients**. For melanoma, one of the most immunogenic tumours that best responds to available immunotherapies, long-term outcomes in patients with advanced disease have improved with the use of an anti-CTLA-4 (ipilimumab), and even more so with an anti-PD-1 (nivolumab), reaching the highest survival rates with the combination of both drugs. Despite these positive results, 50% of patients will not survive more than 5 years¹.

The results are even less satisfactory when these immunotherapies are used in poorly immunogenic tumours. Only Merkel cell carcinomas achieve significant patient survival rates (60%), while in gastric, head and neck, or non-small cell lung cancer, success rates do not reach 20%.

Although we have immunotherapies that have changed cancer management and improved outcomes, much remains to be done².

Contributions of cell therapies

Cell therapies may be the solution to reduce most of the cancer treatment gap.

In cell gene therapies, the patient's own cells are used so that, once modified, they are reintroduced into the body, and their ability to fight tumours is enhanced.

There are different types of cell therapies: extracting cells from the blood and modifying them to attack a tumour or with the TIL technique.

Adoptive T-cell therapies for cancer treatment are based on a logical and simple principle. A small part of the tumour is removed, where the TILs (lymphocytes intended to kill tumour cells) are; then, these lymphocytes are extracted, cultured, expanded in the laboratory and reinfused into the patient in the hope of revitalizing them and increasing their ability to cope with the tumour.

Administration of naturally grown TILs *ex vivo* has been shown to facilitate durable regression of melanoma tumours. However, the generation of TILs is not possible in all patients and has had limited success in other types of cancer.

Advances in genetic engineering have overcome these obstacles by introducing tumour-antigen-targeted receptors into human T cells. It is now possible to genetically engineer lymphocytes to express highly active T-cell receptors or chimeric antigen receptors (CARs) that target various tumour antigens expressed in cancer patients³.

Promises and realities with solid tumour-infiltrating lymphocytes

Treatment with solid tumour-infiltrating lymphocytes has an important advantage over other cancer therapies since it is only administered once in a lifetime.

Patients are hospitalized for approximately 3 weeks. The administration process is complex and is performed in three steps: **1)** lymphodepleting chemotherapy (which depletes lymphocytes); **2)** intravenous infusion of *in vitro* expanded TILs on day 7, and **3)** administration of high doses of interleukin-2 (IL-2), which feed lymphocytes to expand and fulfil their function.

All patients experience temporary grade III–IV side effects, so specialized teams are needed. The high toxicity,

along with the complexity of manufacturing and treatment management, is what is slowing down its clinical application. Despite this, a significant increase in cell therapy research has been registered in the last 5 years and continues to rise, causing a real 'tsunami' of clinical trials in which these immune checkpoint inhibitors are tested.

Among the studies on immunotherapy, cell therapies are clearly predominant, which reveals the enormous potential of this type of precision medicine. It also highlights the fact that most of these studies, unlike what has happened in previous years, do not come from academic centres but have significant support from public and private funding, which is accelerating the clinical introduction of these therapies⁴.

The use of TILs in immunotherapy for cancer patients is not new. Classic studies by Rosenberg *et al.* already showed how the use of TIL and IL-2 in patients with metastatic melanoma achieved higher response rates than those with IL-2 alone or with lymphokine-activated NK⁵.

There are great advantages derived from adoptive T-cell therapies compared to other immunotherapies.

The advantages are mainly three:

- 1)** Ability to deliver large numbers of specific tumour cells.
- 2)** Activation of *ex vivo* T cells and their genetic manipulation to improve their antitumor activity.
- 3)** Alteration of the host's immune microenvironment prior to adoptive transfer, increasing the likelihood of therapeutic success.

With one-time administration of TILs, high and long-lasting response rates are achieved.

In recent years, extensive clinical experience with cell therapies has been accumulated. In a recent meta-analysis by Dafni *et al.*, which pooled the information from various clinical trials on cell therapy in melanoma (most of them in phase I–II), a clear benefit of cell therapy was appreciated, with response rates of 40% (in many cases, long-lasting responses over time)⁶.

A phase I–II clinical trial has been published in which the efficacy of TILs was tested in melanoma patients who had previously received checkpoint inhibitors, with a good response rate in 36% of patients, which was partial, but lasting over time. It is estimated that up to 80% of patients have some type of benefit, even if it is a pre-treated population⁷.

Rohaani *et al.* have proven for the first time the efficacy of TILs in a phase III clinical trial in patients with advanced melanoma. Progression-free survival (PFS) was significantly higher among those who received TIL therapy, as first or second line, than in those treated with ipilimumab. The importance of this study also lies in the high number of patients included (more than 160) and in the long period that its development has required (more than 8 years)⁸. Specifically, this study looked at the intend-to-treat population:

Intend-to-treat population	TIL arm	Ipilimumab arm
PFS (median)	7.2 months	3.1 months
Objective response	49%	21%
Overall survival (median)	25.8 months	18.9 months
Grade U 3 adverse events	All	57%

PFS: progression free survival; TIL: solid tumour-infiltrating lymphocytes.

These differential benefits of TIL therapy are maintained over time, and thanks to the results obtained, the first TIL therapy has been approved in the Netherlands⁸.

Current and future trends

One of the research lines at VHIO Barcelona is to identify which antigens can elicit a robust antitumor response.

TILs are removed from a surgical piece of the patient and expanded, but the goal is to be more selective in this procedure and expand only those TILs that actually recognize the tumour and are active and potent against it.

How does a lymphocyte recognize the tumour? The key is in the receptor itself. **Neoantigens** are alterations within the tumour cell itself that will be expressed or shown in the membrane receptor to be recognised by the T lymphocyte.

TILs can recognize different types of antigens: those that are shared by normal cells (they are overexpressed in the tumour, but are also expressed in healthy tissue), and those

that recognize neoantigens (specific alterations or mutations within the tumour nucleus).

There is already evidence on how this type of neoantigen recognition prioritises the T response in cell therapy (**Figure 1**)⁹.

Neoantigens are now considered to be **optimal targets for cancer immunotherapy** for several reasons:

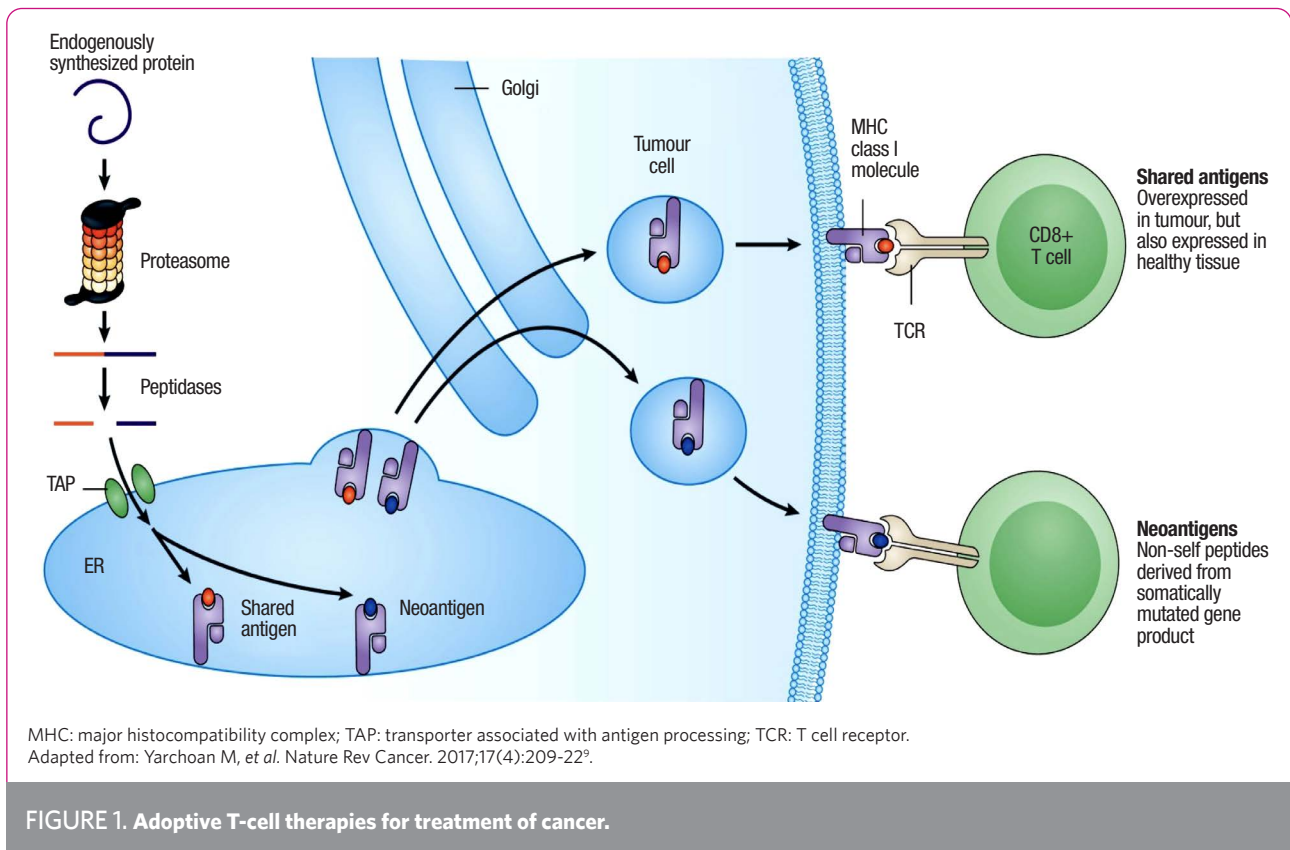
- T-cells targeting neoantigens are not subject to central tolerance and should be safe.
- Neoantigen-specific lymphocytes can be detected in 82% of cancer patients screened, regardless of their histology or mutation burden¹⁰.
- Infusion of T cells targeting neoantigens has shown antitumor efficacy in selected patients with epithelial tumours.
- Mutational and neoantigen load are associated with clinical response to TIL therapy in melanoma.

One of the lines of research at the VHIO is to identify which antigens can elicit a robust antitumour response. The process followed is: TILs are isolated and removed from a biopsy of the patient's tumour and then expanded. Tumour biopsy is sequenced to determine the most plausible neoantigens; these neoantigens are then transfected into B cells to be presented to TILs. It is simulated in the laboratory to being able to choose those lymphocytes selected by neoantigens.

This approach had already been successfully tested in classic studies by Tran *et al.*, which confirmed that a CD4+ T cell response against a mutated antigen can be used to mediate the regression of metastatic epithelial cancer¹¹.

Next-generation TIL therapy targeting neoantigens has some potential advantages:

- **Less invasive approach to generate** TIL from biopsies rather than tumour resections.
- **Safer therapy**, since neoantigens are expressed exclusively in tumour cells.
- **More potent**, as the T-cell receptors targeting neoantigens are not depleted as a result of central tolerance.
- **Diverse and heterogeneous** (varied population of TILs targeting multiple neoantigens).
- **Help for a broad population of patients** with unmet clinical needs.



Next-Generation TIL

An article that gathers the experience of VHIO in the **Next-Generation TIL** trial is on its way. Tumours from 154 patients have been selected for effective expansion of TILs in 82% of tumour biopsies (regardless of tumour type and prior therapies). These expanded TILs are reactive against autologous tumour lines that had been generated from the patient's own biopsy. Then, the existing alterations were evaluated, confirming that the lymphocytes can actually recognize the specific neoantigens of each specific patient.

With these promising results, and thanks to the support and funding of public and private institutions, it has been possible to open this clinical trial with more than 10 patients treated. **This approach, which focused on creating antigen-reactive TILs**, is also being developed by other research groups such as Achilles Therapeutics with two trials: the CHIRON study in advanced non-small cell lung cancer, and the THETIS study in melanoma.

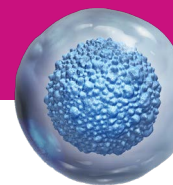
Strategies to improve the efficacy of solid tumour-infiltrating lymphocytes

- 1) **Blockage of immune checkpoints and provision of co-stimulation**, based on the assumption that efficacy could be improved if checkpoint inhibitors are combined with TIL^{12,13}.
- 2) The **contributions of genetic engineering to genetically** modify TILs to strengthen T cells and their anti-tumor efficacy¹².
- 3) The **development of cell therapies** based on the recognition and identification of neoantigens, not in the tumour, but in the peripheral blood¹⁴.
- 4) The **reduction of TIL-based cell therapy toxicity**, which is due, in most cases, to the action of IL-2, opting for new modified interleukins (PragmaTIL study).

Cell therapy, with the latest advances registered, is becoming routine and close to clinical practice. It will undoubtedly increase the number of patients who can benefit from it¹⁵.

References:

1. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, González R, Grob JJ, et al. Long-term outcomes with nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2022;40(2):127-37.
2. Mishima S, Taniguchi H, Akagi K, Baba E, et al. Japan Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion for the diagnosis and use of immunotherapy in patients with deficient DNA mismatch repair tumors, cooperated by Japanese Society of Medical Oncology. *Int J Clin Oncol.* 2020;25(2):217-39.
3. Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol.* 2011;29(11):550-7.
4. Upadhaya S, Nefzelinov ST, Hodge J, Campbell J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(7):482-3.
5. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988;319(25):1676-80.
6. Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourti Z, et al. Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2019;30(12):1902-13.
7. Sarnaik AA, Hamid O, Khushalani NI, Lewis KD, et al. Lifileucel, a Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy, in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2021;39(24):2656-66.
8. Rohaan MW, Borch Th, Van den Berg JH, Met O, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte therapy or ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2022;387:2113-25.
9. Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, Laheru DA. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. 2017;17(4):209-22.
10. Parkhurst MR, Robbins PF, Tran E, Prickett TD, et al. Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1022-35.
11. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science.* 2014;344(6184):641-5.
12. Mardiana S, Solomon BJ, Darcy PK, Beavis PA, et al. Supercharging adoptive T cell therapy to overcome solid tumor-induced immunosuppression. *Sci Transl Med.* 2019;11(495):eaaw2293.
13. Hulen TM, Chamberlain CA, Svane IM, Met O, et al. ACT Up TIL Now: The Evolution of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Adoptive Cell Therapy for the Treatment of Solid Tumors. *Immuno.* 2021;1(3):194-211.
14. Gros A, Tran E, Parkhurst MR, Ilyas S, et al. Recognition of human gastrointestinal cancer neoantigens by circulating PD-1+ lymphocytes. *J Clin Invest.* 2019;129(11):4992-5004.
15. Coukos G. TIL Therapy Entering the Mainstream. *N Engl J Med.* 2022;387(23):2185-6.



Development of cell-based cytokine factories for immunomodulation

Prof. Omid Veisesh

Department of Bioengineering, Rice University, Houston, Texas, USA

Prof. Veisesh holds a PhD from the University of Washington and is a Researcher and Professor of Bioengineering at Rice University, Houston (Texas, USA). With more than a decade of experience in the development of biotechnologies for clinical application, he has 20 registered patents, some already granted. He has been a professor at Rice University in Houston (Texas) since 2017.

Always focused on the development of biotechnological platforms, the results of his postdoctoral research on cell therapies served as the basis for the development of the company Sigilon. Prof. Veisesh worked on a bioartificial pancreas for the treatment of type 1 diabetes. In addition, he has designed a high-throughput line for the synthesis and evaluation of material formulations that resist reactions to foreign bodies.

His laboratory uses advanced nano-, micro- and macro-manufacture techniques, in combination with cell biology and engineering, to develop implantable device platforms designed for *in vivo* chemical detection and therapy delivery. Prof. Veisesh's research focuses especially on technologies to improve the treatment of cancer, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases.

Dr. Veisesh presented the use of advanced materials combined with genetic engineering to create a new generation of cell therapies. His translational work is performed at the biotechnology company Sigilon Therapeutics of Cambridge (Massachusetts, USA). The main objective of the company is to bring the most advanced biological drugs to the patient as effectively and quickly as possible, which entails great efforts (identification of target cells, their transport in reactors and the achievement of the desired effects). This process is especially complex due to the need to isolate and purify these cells, place them in vials, determine the appropriate doses, ensure their stabilization and the possibility of re-administration to the patient – always with a guarantee of maximum safety.



Prof. Omid Veisesh

Benefits of the technological approach

Advances are being made in the search for innovative ways of developing the next generation of advanced cell therapies and progress in the options based on combining target cells with biomaterials.

It is intended to transfer the benefits of these advances to the patient earlier and faster, thus improving logistics and price. To achieve the objective, the **technological approach** is paramount because it allows encapsulating and implanting cells that produce therapeutic enzymes, antibodies, hormones and drugs within the body itself when needed.

This way of proceeding provides, in theory, great benefits such as improved results for the patient compared to the current standard of biological therapy, programmable durability or the achievement of serum protein levels at a constant rate; it is even possible to have a therapeutic agent

for previously untreatable diseases and locally achieve a higher concentration of a certain protein.

We can find a recent example in the field of diabetes as immunomodulatory polymers have been shown to allow long-term glycaemic control. Vegas *et al.* have shown the first long-term glycaemic correction of a diabetic and immunocompetent animal model using human SC- β cells. Implants of these cells (encapsulated with alginate derivatives capable of mitigating foreign body responses *in vivo*) in the intraperitoneal space of Streptozocin-treated C57BL/6J mice (an animal model for chemically induced type 1 diabetes) induced glycaemic correction without any immunosuppression until its removal 174 days after implantation.

Human C-peptide concentrations and glucose sensitivity *in vivo* showed therapeutically relevant glycaemic control, and implants recovered after 174 days contained viable insulin-producing cells¹.

Advances in immunotherapy for cancer

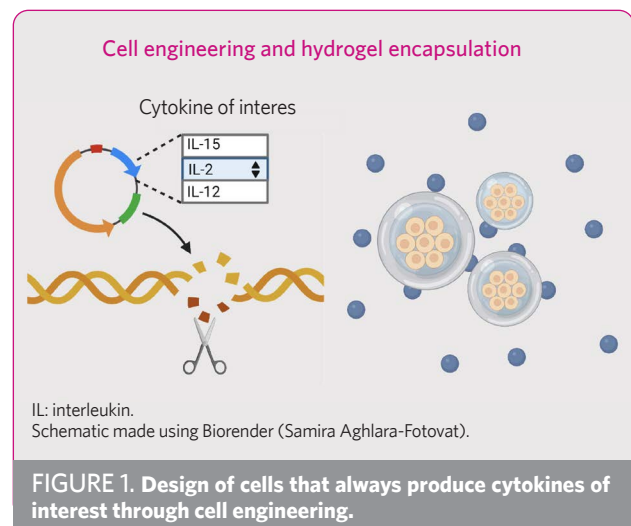
Foreign body response is an immune-mediated reaction that can lead to failure of implanted medical devices and to recipient discomfort. Therefore, **biomaterials** that overcome this challenge are required for the development of medical devices. With this in mind, Vegas *et al.* have generated a large library of variants of one of the most widely used hydrogel biomaterials, alginate. After the evaluation of the materials *in vivo*, three analogues that substantially reduce reactions to foreign bodies in rodents and, for at least 6 months, in non-human primates have been identified. A unique hydrogel surface is created that inhibits macrophage recognition and fibrous deposition. Thus, the duration of the activity of the therapy administered could be controlled².

From this approach (identification of materials that mitigate the response to foreign bodies in primates and the evidence of how immunomodulatory technology avoids the detection of macrophages) a wide range of options for the discovery of other materials that achieve this same effect becomes available.

Cytokine therapy is also a field of research very interesting. Work is being done on the exogenous control of the activation states of the immune system using implantable cytokine factories.

Through **cell engineering**, cells that always produce cytokines of interest are encapsulated in biocompatible

hydrogel that protects them from the host's immune system are designed (**Figure 1**).



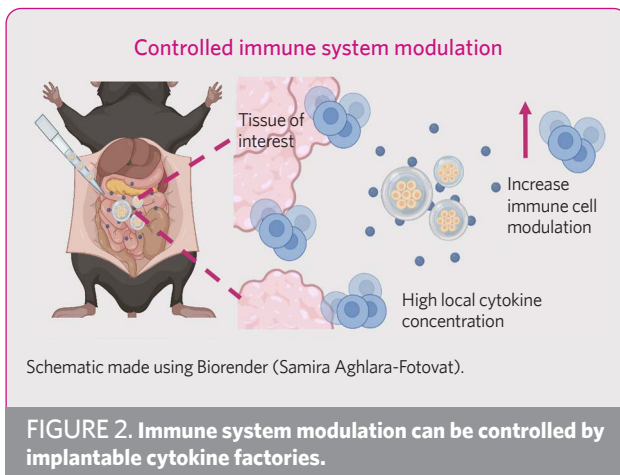
Interleukin 2 (IL-2) is a very potent messenger molecule that is involved in the activation of immune cells, particularly T lymphocytes, macrophages and natural killer (NK) cells. The activation of these cells enhances their action against tumour cells. However, historically this cytokine has been administered through the bloodstream and in a non-selective manner. The blood has many reservoirs of immune cells, which are all activated simultaneously, helping to generate 'cytokine storms' and, therefore, limiting their therapeutic usefulness. For this reason, this type of approach usually requires hospital admission and very careful dosing in the body.

To test the effect of **controlled modulation of the immune system**, animal models of disease are developed, and the degree of activation/repression of the immune system is quantified over time after administration (**Figure 2**).

Cytokines work differently in the human body. They are usually produced locally in various locations, have a short life and their onset of action is very fast. An injection is required to incorporate cytokines into the human body.

A major limitation of conventional therapies based on systemic cytokines is that the inherent instability of systemic cytokines requires high doses as well as frequent injections/infusions.

Based on this reality, Prof. Veisheh's research group has approached this issue from a different perspective, **creating factories to produce cytokines locally that are kept out of the bloodstream**. His platform can very quickly cycle, validate, and test different cytokines from different individuals or combinations of several cytokines.



Many human clinical trials have evaluated cytokine therapies for cancer and autoimmune diseases. Of these, the work conducted in ovarian cancer is of special interest, where diagnosis is usually late, the general prognosis poor and recurrence is rarely curable. Despite the existence of numerous resources, the outcomes can be improved³. However, intraperitoneal administration of IL-2 has shown promise in phase II clinical trials. It has been seen that weekly intraperitoneal infusions of IL-2 in ovarian cancer patients with persistent (platinum-resistant) or progressive (platinum-refractory) disease are associated with an overall response rate of 25%, with a median survival of 2.1 years⁴. It has also been confirmed that 16 weekly infusions of IL-2 administered through an indwelling peritoneal catheter with 2 litres of 5% sterile dextrose have the potential to achieve lasting remissions in ovarian cancer (one case with 14 years of remission) and low toxicity, although with significant drawbacks (only 55% of cases completed the 16 weeks and most patients experienced some mechanical catheter failures and infusion pain)⁵. Despite these advances, advanced methods for administering this interleukin are required.

New perspectives

To overcome the current difficulties, the implantation of **cytokine 'factories'** that deliver a potent, persistent and regulated dosage to the tumour-containing cavity is intended, which will substantially reduce the amount of IL-2 required.

All this by means of small 'beads' or capsules (each 1.5 mm), which house thousands of cells modified with cell engineering and are capable of generating natural cytokines.

Nash *et al.* have recently published the result obtained with a platform for the administration of these cytokine 'beads' for the eradication of intraperitoneal tumours, transferable to clinical practice that overcomes the limitations associated with conventional treatment with cytokines (high-dose infusions that can generate antibodies against the drug and/or systemic side effects that reduce long-term benefits)⁶.

This cytokine delivery platform consisted of human ARPE-19 cells (RPE, retinal pigmented epithelial cells) that produce natural cytokines encapsulated in polymers. The administration of these capsules adjacent to the tumour achieves a dose modulation with spatial and temporal control, which allows immunotherapy against peritoneal cancer without systemic toxicities.

Therapy with the IL-2-producing cytokine factory eradicates peritoneal tumours in ovarian and colorectal mouse models.

Computational pharmacokinetic modelling predicts clinical translatability to humans. This platform manages to elicit T-cell responses in 'natural health products', in line with biomarkers that report the efficacy of treatment without toxicity. This confirms the safety and efficacy of IL-2 cytokine factories in preclinical animal models, which reveals a sustained production of native IL-2 (hIL-2) with a high concentration in the intraperitoneal space, which warrants the start of clinical trials in humans⁶.

Recent research has corroborated that *in vivo* cytokine dosing can be controlled by modulating the number of capsules per dose. The local concentration of cytokines is at least 100 times higher than the systemic concentrations derived from multiple doses. Cytokine concentration gradients are crucial for sufficient activation of immune cells without causing the widespread toxicity seen with systemic injections. The ability to deliver more than one dose of these implantable cytokine factories increases the translatability of the platform and, in addition, highlights a possible lack of antidrug antibody formation⁶.

Producing the biological drug locally (at the site of the tumour) offers many other possibilities.

By producing high concentrations of the natural cytokine generated by our body, it is possible to enhance the antitumor effect and there may be other potential advantages related to efficacy⁶. The native cytokine (hIL-2) achieves a potency three times greater than the recombinant (rIL-2) cytokine.

Ovarian and colorectal cancer

To prove these benefits, a model in ovarian cancer was developed and the study ID8 Fluc IP was initiated. This study uses ID8 cells designed to express firefly luciferase. We compared the antitumor effects of *in vivo* RPE-IL2 in monotherapy with rIL-2 injections.

Fluc 5e6 ID8 cells were injected into the intraperitoneal space of C57BL/6 mice (developing tumours similar to those seen in women with stage III and IV ovarian cancer). One week post injection, mice were imaged with IVIS® (*In Vivo Imaging System*) to calculate tumour burden prior to treatment. The results show that RPE-mIL2 capsules (cytokine factories) are capable of eradicating ID8 tumours established in an albino mouse model of ovarian cancer in a much more significant way than rIL-2⁶.

These capsules, which allow high doses of IL-2 administered locally, have been shown to induce T-cell activation and proliferation after one week of treatment. Despite originating locally and deploying their effects at that level, they also produce systemic immune activation (the population of immune cells 'chases' the tumour when it spreads to other parts of the body). In fact, mice successfully treated with this type of approach – and thanks to the educational effect of memory T cells – are now immune to the same type of tumour, which reveals the effect of systemic immune training.

A model for colorectal cancer has been generated, assuming that MC38 cells are a tumour model of immunosensitive murine colon adenocarcinoma, which also shows the antitumor effects of *in vivo* RPE-IL2 monotherapy. The results show a systemic immune response, which suggests that local administration of AVB-001 capsules produces system-wide protective memory immunity against tumour cells.

In addition, the benefit derived from the control of the number of capsules with RPE-IL2 that must be administered and the generation of localized effects in the interstitial space, without direct access to the bloodstream, has been confirmed. By avoiding the presence of high concentrations of IL-2 in the bloodstream, adverse effects are avoided.

In non-human primates, cytokine factories are well tolerated and induce CD8+ T-cell proliferation locally, without causing regulatory T-cell expansion.

In the last two decades, several research groups have accumulated a positive experience with the pleural administration of IL-2 to treat mesothelioma^{7,8}, which has encouraged testing this approach with cytokine factories and the IL-2 delivery system in a local, safe and clinically translatable way, to increase the potency of therapy and minimize systemic exposure to cytokines⁹.

Specifically, the therapeutic efficacy of IL-2 cytokine factories has been evaluated in a mouse model with malignant mesothelioma, which has achieved 150 times higher concentrations of IL-2 in the local compartment and with limited leakage to the systemic circulation. The AB1 tumour burden reduced by 80% after 1 week of treatment with monotherapy, and all seven animals exhibited tumour eradication without recurrence. The safety of this treatment is confirmed, and IL-2 cytokine factories favour the eradication of aggressive malignant mesothelioma tumours in a mouse model, give protection against tumour recurrence, and increase the therapeutic efficacy of therapy with the aPD1 protein⁹.

These promising experimental results drive the technology transfer to the clinic – an effort that is supported by increased funding for clinical trials.

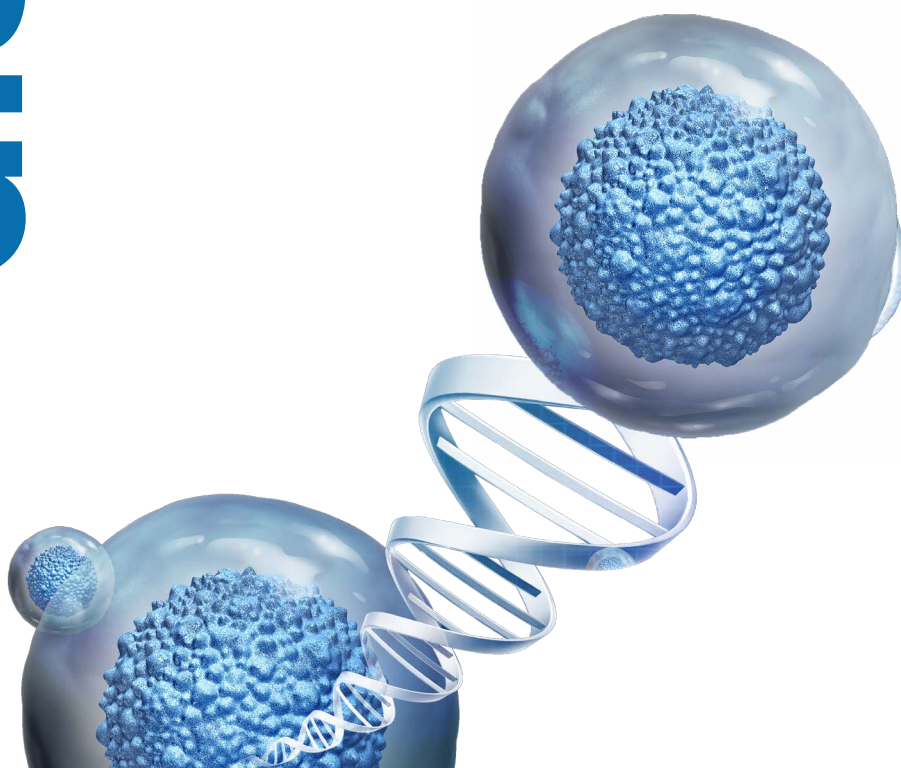
References:

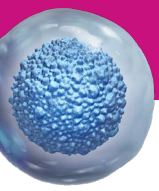
1. Vegas AJ, Veisheh O, Gürtler M, Millman JR, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med*. 2016;22(3):306-11.
2. Vegas AJ, Veisheh O, Doloff JC, Ma M, et al. Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates. *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):345-52.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs H, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
4. Vlad AM, Budiu RA, Lenzner DE, Wang Y, et al. A phase II trial of intraperitoneal interleukin-2 in patients with platinum-resistant or platinum-refractory ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(2):293-301.
5. Minor DR, Moores AP, Chanc JK. Prolonged survival after intraperitoneal interleukin-2 immunotherapy for recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol Rep*. 2017;22:43-4.
6. Nash AM, Jarvis MI, Aghlari-Fotovat S, Mukherjee S, et al. Clinically translatable cytokine delivery platform for eradication of intraperitoneal tumors. *Sci Adv*. 2022;8(9):eabm1032.
7. Astoul P, Picat-Joossen D, Viallat JR, Boutin C. Intrapleural administration of interleukin-2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a Phase II study. *Cancer*. 1998;83(10):2099-104.
8. Castagneto B, Zai S, Mutti L, Lazzaro A, et al. Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: Results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer*. 2001;31(2-3):303-10.
9. Nash AM, Aghlari-Fotovat S, Castillio B, Hernandez A, et al. Activation of adaptive and innate immune cells via localized IL2 cytokine factories eradicates mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res*. 2022;28(23):5121-35.

discussion

Moderator:
Erika Pastrana

Round table:
Dr. Luca Biasco
Prof. Evelyn Ullrich
Dr. Elena Garralda
Prof. Omid Veis





To conclude, a **discussion** with the speakers was held, moderated by **Erika Pastrana**, to deepen and comment on the different approaches described throughout the session, and to answer questions from the audience about cell therapies.

Prof. Omid Veisheh, you have come a long way in your research. What do you think is the next step from everything you've learned?

Omid Veisheh: My personal motivation is to improve patients' lives with our engineering approaches. In my talk I presented a simple approach that more-or-less worked but could not be adopted generally. This is the time when engineers must step in to find new solutions.

I am curious about toxicity; once it occurs, doses are stopped and it is addressed, quickly reversing when the administration ceases. How do you deal with toxicity once you have injected the 'beads' or capsules, since the patient will continue having IL-2 after a month?

Omid Veisheh: Immunotherapy has always had that challenge, so we thought of something that would work in a shorter period of time (several weeks to a month). But it is true that, if an antibody is injected, the same challenge arises, since it will circulate for a few weeks. Thanks to the great work that clinicians have done, there has been much improvement in the use of drugs, such as steroids, with which the activity of the immune system can be reduced if necessary. In our case, we believe that it is **not necessary to have such strict control as that which occurs today in patients with immunotherapy**.

What is your opinion on the most promising aspects of combination therapies in your field?

Evelyn Ullrich: You don't need to have just one approach, but to combine several technologies. I believe that modifying immune cells and stem cells requires cytokines, so it would be a great advantage to provide higher doses of cytokines in the areas where they are needed, and to be able to direct immune cells where needed and then be able to remove them later on.

The big challenge is to figure out which **personalized approach** is best for each patient and his/her disease. We have a lot of knowledge; we need to bring it together and apply preclinical and functional discoveries, as well as next-generation sequencing approaches to tumour cells.

Elena Garralda: I completely agree. **Combinations** are the next step. The problem is to know what to combine, and which patient needs each combination. The association of checkpoint inhibitors is a clear option, as shown by the clinic, and because of its great potential to be related to many tumour types.

In immunogenic tumours, this is a combination that makes a lot of sense. Cold tumours, which are not so immunogenic, are the problem. In the latter, other combinations are needed, such as T-cell enhancers that allow them to feel 'attracted' to the tumour

in a different way. The key will be to find the specific mechanism of that tumour and its immunogenicity.

Omid Veisheh: Combinations are going to be the future for cancer, since it is a very complex disease, and we are beginning to decipher how the immune system perceives it and all the mechanisms that the tumour uses to 'turn off' the immune system. It will be important to be able to demonstrate that each of the components of the therapeutic combination does something unique in patients. And it's unlikely that we'll find something that doesn't work well on its own but is effective in combination. The efficacy of monotherapy must be tested in clinical trials and then combined.

Luca Biasco: I work mainly with genetic diseases where the use of combination therapies is not usual. However, we are trying to combine genetic defects to modify stem cells and make them functional. We combine gene therapy *in vivo* with an antibody therapy that allows the modified cells to expand and those that don't to be removed; that is, two mechanisms are used at the same time: cells are modified and those that have not been altered are depleted, thus providing greater space for the corrected cells to expand.

In my opinion, **the future will be *in vivo* gene therapy that will make a difference in clinical translation**.

If the patient is already immunocompromised (i.e. his/her immune system is already damaged prior to the onset of cancer), how will these immunotherapies adapt? Is there any research along these lines?

Elena Garralda: We have little information about these therapies, which are experimental. Initial trials of immune checkpoint inhibitors excluded patients with primary immunodeficiency, but now that there is more experience with those inhibitors that have been approved, their efficacy in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection is being evaluated. Information is beginning to be collected on this topic, but there is not much information about most of these therapies – which are in phase I-II – in immunocompromised patients.

Omid Veisheh: Immunotherapy is still very new, but it's exciting to think that many of the technologies and tools being developed today could also be used for autoimmune diseases and immunocompromised patients. We know that we cannot vaccinate certain patients due to the improper functioning of their immune system, but we do have the ability to produce antibodies for them. Perhaps we can skip the vaccination step and produce neutralizing antibodies in the patient. In this sense, we have recently obtained support from the GATES Foundation to research on this topic in subjects with HIV.

Why are B cells used for antigen presentation instead of others such as dendritic cells?

Elena Garralda: In our team, Elena Gors already had experience with the use of these cells. In addition,

B cells are the easiest to reproduce in the laboratory and the best to obtain from patients.

It has been mentioned that CAR-NK cells can be generated from a lineage of NK cells. What happens to them after infusion? Do they live forever in the patient?

Evelyn Ullrich: This is a cell like the natural killer cell (NK), called NK92, which was isolated from a patient with NK-cell lymphoma, so there are some safety concerns.

In the preclinical setting, this cell can proliferate by adding IL-2, a key cytokine for these NK92 cells. Now that it is being applied in the first human trials, it is necessary to irradiate the cell line earlier, making them only functional for a few days, after which they can no longer proliferate and thus avoid safety problems. We are now developing a product with primary NK cells that we can let proliferate.

Prof. Omid, you have presented a great tool to us, but sometimes we have cell lines in the lab that are dependent on the presence of some cytokine or other biological molecule. Have they been tested *in vitro* for these functions?

Omid Veisheh: Yes, they work very well; so many collaborators ask us to make some for them. We cryopreserve them as 'balls' for distribution, so you only need to pour a couple into a large reactor to produce the necessary cytokines. They can also work in that context.

How do these immunotherapies and cell therapies combine with current chemotherapy? Will they replace the latter?

Omid Veisheh: **Chemotherapy** is a very crude way to treat cancer. In some cases, it works well, but the side effects are terrible, and patients can develop resistance.

Chemotherapy, when it works, does better in terms of durability and, although there are side effects, it is better than not administering any treatment to the patient.

For their part, **cell therapies** represent a new arsenal to complement current treatments, and I hope that over time they will replace them.

Targeted therapies are also useful because they can target specific mutations in tumour cells. The more options there are for patients, the better.

Elena Garralda: I agree. Doing without chemotherapy is difficult, but we must investigate how we can combine it. It can be used to potentiate tumour death, make it more immunogenic, and potentiate it with checkpoint inhibition. The combination of these therapies works better than the individualized use of one of them, but it depends on each patient. I don't think chemotherapy will be eradicated, but it can be relegated to a secondary plane.

Evelyn Ullrich: All the subtypes of these diseases are classified according to the different genetic variations, and on this basis the decision is made about which patients require higher doses and what type of chemotherapy, or if they require an allogeneic cell transplant. Therefore, I believe that the protocols can be replaced by others that provide for low-dose chemotherapy and that prepare the patient for an infusion of modified immune cells. Even so, it is dangerous to change something that works, since – despite the side effects of chemotherapy – the

probability of survival is very high. We must go step by step.

What do you think about acquired resistance to treatments and what are your prospects for the future?

Evelyn Ullrich: There are many factors involved in generating treatment resistance. One of the possibilities is that the tumour has a heterogeneous composition and some of the cells may be resistant to therapy, producing selective pressure for resistance to develop. Sometimes there are tumour-initiating cells even though the tumour has not developed. The features of these cells are not very well defined, so they are not detected in the analyses and, therefore, the tumour can grow some time later.

It is also possible that the tumour environment contains factors that reduce the tumour's immune response of resistance to therapy. Now there are tools that allow us to determine if we should change or modify the treatment in those cases.

Elena Garralda: Resistance is one of the biggest challenges of antitumor treatment, and I don't think there will be a treatment for which resistance does not occur.

There is an increased chance of finding tumour-infiltrating lymphocytes in patients treated with immune checkpoint inhibitors, so it is possible that there is some editing as a resistance mechanism.

Your presentations are hopeful in terms of the technologies that are coming. These are very complex and expensive tools. In truth, what impact can we expect from them?

Evelyn Ullrich: The clinical translation of immunotherapy is very long and challenging, especially because it is an expensive procedure. We must optimize production time and reduce cost. One tool to highlight is the **non-viral editing of immune cells**.

We can also improve the outcome and persistence of immune cells with the **application of cytokines *in vivo***.

Luca Biasco: The main evolution in stem cell gene therapy is the *in vivo* approach. This field has evolved extraordinarily in the last 2 years, and we can now reach the targets *in vivo*.

The *ex vivo* approach works very well, but it is very expensive, so the biggest challenge of gene therapy is to reduce costs: these are the most expensive drugs on the market, but they work. Cost reduction can be achieved through new approaches, such as the *in vivo* approach, or by trying to reduce preclinical costs.

Elena Garralda: The high cost of therapies is challenging in cancer management. **The access to these drugs needs to be sustainable.**

Omid Veischi: In our case, we are now at the stage of industrializing the process, which implies paying attention to its cost to make therapies more accessible.

TERAPIAS CELULARES:

nuevas oportunidades de la mano de la ingeniería genética y la inmunoterapia

Después de muchos años de investigación, y un uso clínico centrado principalmente en los trasplantes de médula ósea, la utilización de la **terapia celular** está finalmente expandiéndose en la práctica clínica. Gracias a las **nuevas técnicas de ingeniería genética**, la terapia celular se posiciona como un tratamiento líder para la cura de ciertos tipos de cáncer, así como de enfermedades neurológicas y autoinmunitarias.

Las terapias celulares, basadas en la administración de células vivas para combatir una enfermedad, han experimentado un crecimiento extraordinario en su aplicación clínica en los últimos años. Las primeras aplicaciones de la terapia celular en humanos comenzaron en 1950 con los trasplantes de médula ósea en pacientes con cánceres hematológicos. El éxito de estos tratamientos proporcionó años de evidencia sobre el potencial que tienen las células como nuevos agentes para tratar enfermedades. Con la aprobación del uso de células 'CAR-T', genéticamente alteradas para tratar linfomas, y su éxito en el tratamiento de cánceres sólidos y hematológicos, este campo ha recibido un impulso sin precedentes. Los éxitos más recientes incluyen el uso de células madre para reparar córneas dañadas o para tratar la enfermedad de Crohn.

En esta **15.ª Conferencia** se abordan las aplicaciones clínicas actuales de la terapia celular para el tratamiento del cáncer. Se debaten los avances en el conocimiento del sistema inmunitario que han permitido el diseño de estrategias más seguras y el empleo de técnicas de alteración genómica más eficaces, así como las perspectivas futuras que esta tecnología puede ofrecer para las enfermedades hasta ahora incurables.

CELLULAR THERAPIES:

new opportunities offered by genetic engineering and immunotherapy

The use of **cell therapy** is finally expanding into the clinic after many years of research, with its clinical use focused primarily on bone marrow transplantation. Thanks to the use of new **genetic engineering techniques**, cell therapy is positioned as a leading treatment approach for the cure of some cancer types as well as other neurological and autoimmune diseases.

In recent years, cell therapies, based on the use of live cells to fight a disease, have experienced an explosive growth in clinical application. The first applications in humans began in 1950 with bone marrow transplants to treat patients with haematological cancers. The success of these treatments provided years of evidence about the potential of cells as new agents to treat diseases. With the approval of genetically altered 'CAR-T' cells to treat lymphomas, and their success in treating solid and hematological cancers, the field has seen an unprecedented explosion. Recent successes include the use of stem cells to repair damaged corneas, or to treat Crohn's disease.

This **15th Conference** covers recent clinical applications of cell therapy to treat cancer. Advances in the understanding of the immune system that have led to safer strategies and more efficient genome disruption techniques are discussed. As well as the future prospects that this technology may offer for treating hitherto incurable diseases.

