

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LINFOCITOS T CON
RECEPTORES QUIMÉRICOS CONTRA EL ANTÍGENO
CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) PARA UNA POTENCIAL
INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

PAULA CAROLINA GONZÁLEZ FIGUEROA

TEMUCO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LINFOCITOS T CON
RECEPTORES QUIMÉRICOS CONTRA EL ANTÍGENO
CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) PARA UNA POTENCIAL
INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

PAULA CAROLINA GONZÁLEZ FIGUEROA
PROFESOR GUÍA: ÁLVARO LLADSER CALDERA

TEMUCO – CHILE

2012

**OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LINFOCITOS T CON
RECEPTORES QUIMÉRICOS CONTRA EL ANTÍGENO
CARCINOEMBRIONARIO (CEA) PARA UNA POTENCIAL
INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL**

PROFESOR GUIA

: ALVARO LLADSER CALDERA

Bioquímico, Ph.D. en Ciencias Biomédicas,
Universidad de Chile

Laboratorio de Inmunoterapia Génica,
Fundación Ciencia y Vida

PROFESOR CONSEJERO

: PRISCILLA BREBI MIEVILLE

Ingeniera Forestal, Ph.D. en Ciencias
m/Biología Celular y Molecular Aplicada,
Universidad de La Frontera.

Facultad de Medicina, Universidad de La
Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

“En mi opinión, lo único que necesita la fe es el convencimiento de que esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena de conseguirse”. (Rosalind Franklin, 1940)

II
DEDICATORIA

A Carlos y Luz Elena

III

AGRADECIMIENTOS

Durante el arduo proceso de aprendizaje en el que me he sumergido, han participado personas que indirecta o directamente me han enseñado, instruido, debatido, corregido y alentado a seguir. Gracias a ellos, a quienes junto a mi o a cientos kilómetros me han apoyado y han tenido fe en mi trabajo cuando los resultados han sido favorables, y sobre todo cuando no.

Agradezco al equipo humano del Laboratorio de Inmunoterapia Génica de la Fundación Ciencia & Vida, a mi tutor Dr. Álvaro Lladser, y a mis compañeros por el tiempo dedicado, por compartir conocimiento, experiencia y risas.

Agradezco a mis amigos y compañeros biotecnólogos, Charlotte y Christian, por ser mis pilares a lo largo de toda la carrera, a mi profesora cogaía Dra. Priscilla Brebi, así como a los profesores que me formaron y guiaron en la Universidad de la Frontera.

Agradezco a mi familia por su amor incondicional, principalmente a mis padres por estar siempre presentes a la distancia, por apoyarme en cada proyecto que he emprendido y por inculcarme los valores y principios que me han llevado a perseverar hasta el final por mis metas.

IV INDICE

1	INTRODUCCIÓN	9
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Cáncer en Chile y el mundo	11
2.2	Cáncer gástrico y colorrectal	12
2.3	Inmunoterapias como tratamiento para combatir el cáncer	14
2.4	Antígeno carcinoembrionario (CEA)	16
2.5	Inmunoterapias específicas activas desarrolladas contra cánceres del aparato digestivo	17
2.6	Terapias adoptivas de linfocitos T antitumorales	18
2.7	Terapias adoptivas con linfocitos T modificados con receptores quiméricos antitumorales	20
2.8	Retrovirus	25
2.9	Transferencia génica mediada por gammaretrovirus	27
3	HIPOTESIS	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo general	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	MATERIALES Y METODOS	31
5.1	Identificación y amplificación de plásmidos	31
5.2	Líneas celulares y material biológico	33
5.3	Producción de partículas retrovirales no replicativas	33
5.4	Transducción de linfocitos T con vectores retrovirales	34

5.5	Determinación del porcentaje de linfocitos T transducidos	35
6	PRESENTACION DE RESULTADOS	37
6.1	Obtención de plásmidos Env, Gag-pol y CAR	37
6.2	Transfección de HEK 293T con lipofectamina <i>versus</i> CaCl ₂	38
6.3	Transducción de Linfocitos T	41
7	DISCUSIÓN	45
8	CONCLUSIONES	49
8.1	Vector de transferencia génica	49
8.2	Sobrenadante Viral	49
8.3	Viabilidad Celular	49
8.4	Mantenimiento del cultivo de linfocitos posterior a la transducción	50
8.5	Propuesta de trabajo futuro	50
9	RESUMEN	52
10	SUMMARY	53
11	LITERATURA CITADA	54
12	ANEXOS	58

1 INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, a nivel mundial el cáncer provoca un 13% de las defunciones en la población total. Para el año 2030 se prevé un aumento de la mortalidad por cáncer de un 45%, donde los tipos más prevalentes de cáncer seguirán siendo el pulmonar, gástrico, hepático y colorrectal. En Chile, el cáncer es la causa de una de cada cuatro defunciones, donde los cánceres del aparato digestivo aparecen como la principal causa de muerte por tumores, constituyendo un problema importante de salud pública y economía nacional.

En vista de estos antecedentes, se han desarrollado diversas terapias para prevenir la aparición y combatir la progresión de esta patología. Con el aumento del entendimiento de los mecanismos de reconocimiento que utiliza el sistema inmune para eliminar células tumorales se han propuesto distintas técnicas que pretenden inducir la regresión de tumores en pacientes con cáncer. Dentro de ellas, las vacunas de antígenos tumorales como inmunoterapia activa, fueron ampliamente usadas para lograr este objetivo, ya que buscan estimular el sistema inmune del paciente in vivo para inducir respuestas de linfocitos T capaces de eliminar las células afectadas mediante el reconocimiento específico de antígenos tumorales expresados por ellas. Este tipo de terapia se ha probado en estudios preliminares in vivo con resultados prometedores, sin los efectos secundarios no deseados de las terapias convencionales (Health, 2012).

Una estrategia que está revolucionando el campo de la inmunoterapia es la modificación de linfocitos T mediante técnicas de ingeniería genética con “receptores de antígeno quiméricos” (CARs). Básicamente, los CARs consisten en proteínas de dominio transmembrana derivadas del receptor de linfocitos T y proteínas de dominios intracelulares capaces de llevar a cabo la transducción de señales, acopladas a dominios extracelulares provenientes de la región variable de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos tumorales que en conjunto son capaces de iniciar la activación antígeno específica de linfocitos T.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de superficie presente en células epiteliales cuya expresión se ve sostenida y aumentada en tumores del aparato digestivo, lo que lo ha convertido en blanco de numerosas terapias antitumorales. Esta tesis propone optimizar el proceso de transducción de linfocitos T con CARs específicos para el CEA como primer paso para su aplicación en una posible inmunoterapia adoptiva contra cánceres del sistema digestivo.

Hoy en día sigue siendo necesario llevar a cabo estudios acuciosos en humanos, que nos permitan tener pruebas inequívocas de la eficacia y seguridad de estas inmunoterapias, más allá de los casos clínicos aislados. En este contexto, el mayor obstáculo que debe ser sorteado, además de nuestro limitado entendimiento de la fisiopatología de muchas enfermedades, es la baja eficiencia de transducción y expresión *in vivo* de transgenes con los vectores actualmente utilizados, lo que se ha reflejado en la baja tasa de casos clínicos exitosos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cáncer en Chile y el mundo

Para el año 2008 se reportaron 12,7 millones de nuevos casos de cánceres en el mundo y alrededor de 7,6 millones de muertes por esta causa. La mayor incidencia de casos, tanto para hombres como para mujeres, se encuentra en América del norte (608,4 casos por cada 100.000 habitantes), Australia y Nueva Zelanda (633,2 casos por cada 100.000 habitantes), en Europa del norte (546,7 casos por cada 100.000 habitantes) y en Europa del oeste (605,8 casos por cada 100.000 habitantes) según datos registrados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (IARC, 2012).

Los cánceres más comunes en países desarrollados están asociados a tasas de sobrevivencia relativamente altas (cáncer de próstata, mama y colorrectal), mientras que en países de regiones menos desarrolladas, los cánceres más comunes están asociados a tasas más desfavorables de sobrevivencia (cáncer de hígado, esófago y gástrico). Por lo tanto, si bien los países desarrollados tienen mayor incidencia, los países menos desarrollados tienen igual tasa de mortalidad por cáncer, debido principalmente a las diferencias en los sistemas de salud que permiten el diagnóstico y tratamiento oportuno de la población.

En Chile no existe un registro de la incidencia de casos de cáncer en la población a nivel nacional. Solo en el año 2001 se registraron dos iniciativas a cargo de la IARC. La mayor tasa de incidencia estandarizada por edad corresponde al cáncer de próstata, seguido por el de mama, gástrico y de pulmón. Existen 36.000 nuevos casos de cáncer cada año y la población tiene un 18,2% de riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer antes de los 75 años.

2.2 Cáncer gástrico y colorrectal

El cáncer colorrectal representa un problema importante en la salud pública y en la economía mundial. Según los datos registrados en 2008 por la IARC, dentro de los diferentes tipos de cánceres, el cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más común en hombres (663.000 casos, representando el 10% del total) y el segundo más común en mujeres (571.000 casos, 9,4% del total) a nivel mundial. Se estima que son diagnosticados más de un millón de casos nuevos por año, con una incidencia de 0,025% en los países desarrollados. A nivel mundial se registran alrededor de 608.000 muertes por cáncer colorrectal en el mundo, lo que constituye el 8% del total de muertes por cáncer, siendo así el cáncer de colon la cuarta causa de muerte por tumores malignos.

Siguiendo al cáncer colorrectal, el cáncer gástrico, o cáncer de estómago, es el cuarto tipo de cáncer más común en el mundo, registrándose alrededor de 1 millón de nuevos casos anualmente y representando así el 7.8% del total de casos de cánceres. El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por tumores malignos a nivel mundial, constituyendo el 9,7% del total. Con respecto al cáncer de vesícula biliar, a pesar de que a nivel mundial tiene tan solo la novena posición en cuanto a incidencia (3% del total) y mortalidad (2% del total) (Figura 1), a nivel nacional es la segunda causa más común de muertes por cáncer en mujeres después del cáncer de mama.

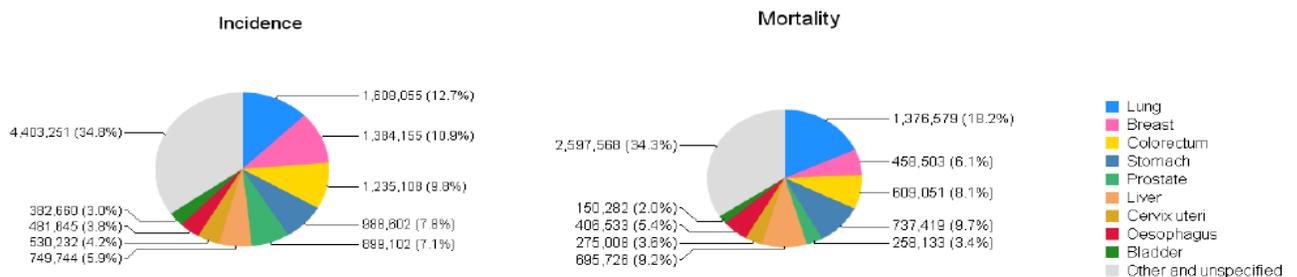


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. Datos registrados por la *International Agency for Research on Cancer* de la Organización Mundial de la Salud.

Según los datos estadísticos del Ministerio de Salud en Chile, los casos de muerte debido a cánceres del sistema digestivo (incluyendo estómago, colon, recto y vías biliares) constituyen el 30,3% (40,5 casos por cada 100.000 habitantes) del total de muertes debidas a tumores malignos en el año 2009. De éstas, el 14,8% del total de muertes causadas por tumores malignos se debe a cáncer gástrico, 8,0% a cáncer de vesícula y 7,5% a cáncer colorrectal. Así, el cáncer gástrico, el de vías biliares (vesícula, de otras partes y no especificadas de las vías biliares) y el colorrectal ocupan respectivamente el primero, tercero y cuarto lugar de causa de muerte por cáncer en nuestro país. Concretamente, según las estadísticas 2008-2009 del Ministerio de Salud, se calcula que actualmente fallecen más de 6.500 personas por año en nuestro país debido a alguno de estos cánceres. La incidencia de muerte por estas causas en Chile comienza alrededor de los 30 años de edad y aumenta progresivamente con la edad.

Generalmente, la detección de estos tipos de cánceres ocurre en estadios tardíos, cuando el cáncer ya se encuentra significativamente avanzado y la extirpación del tumor no es suficiente para evitar la aparición de nuevos focos neoplásicos. Por esto, se hacen necesarios tratamientos post-cirugía. El tratamiento actual para estos cánceres se basa en una multimodalidad terapéutica que reúne a cirujanos, oncólogos y radioterapeutas con elevados costos por paciente tratado. Los regímenes de quimioterapia llevados a cabo comúnmente para el tratamiento post-cirugía de estos cánceres tienen precios que, en promedio, van actualmente desde los 21.000 dólares (tratamiento con FOLFOX®, fármaco en base a ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino) hasta los 32.000 dólares (tratamiento con FOLFOXFIRI®, fármaco en base a ácido folínico, 5-fluorouracilo e irinotecán) por paciente tratado a lo largo de su enfermedad (Haller, 2007). Los resultados obtenidos con el esquema habitual muestran que el porcentaje de supervivencia 5 años post cirugía es del 80-90% para pacientes en estadio I (invasión de la submucosa), 70-75% en estadio II (invasión de tejidos pericólicas y/o del peritoneo visceral), 35-50% en estadio III (compromiso ganglionar a distancia) y menos del 7% en estadio IV (metástasis en al menos un órgano) (Edge y Compton, 2010; Rao *et al.*, 2011). La recurrencia de la enfermedad, ya sea local o a distancia, significa para el paciente un compromiso significativo de su calidad de vida y reduce sus expectativas de vida dramáticamente. Para los sistemas de salud en Chile y el mundo, la cobertura del tratamiento para esta enfermedad representa un desafío económico importante

debido al elevado costo de esquemas de segunda línea, además de los costos propios de nuevas cirugías y de cuidados paliativos. Por ello, actualmente se encuentran múltiples líneas de investigación que apuntan a mejorar el control total de la enfermedad.

La baja efectividad de los tratamientos postoperatorios convencionales en la eliminación de la enfermedad, los altos costos de estos, el alto número de muertes anuales en Chile debido a esta enfermedad, y los severos efectos secundarios que se traducen en una pésima calidad de vida de los pacientes que sufren de estos cánceres, hacen muy necesario la generación de una nueva terapia complementaria que impacte significativamente en el número de pacientes que se recupera de la enfermedad. Debido a que el sistema inmune posee la capacidad de eliminar células tumorales de forma específica y, por lo tanto, impedir la formación de focos neoplásicos (Merhavi-Shoham *et al.*, 2011), resulta una buena oportunidad el manipular y potenciar la respuesta inmune antitumoral en los pacientes con cánceres del sistema digestivo. Una potenciación adecuada de la respuesta inmune antitumoral para impedir la reaparición de la enfermedad post-cirugía resulta una propuesta atractiva y promisoría, que debe abordarse a través de laboratorios de investigación especializados en inmunología que sean capaces de generar y evaluar la efectividad de una inmunoterapia potente y sana a la vez.

2.3 Inmunoterapias como tratamiento para combatir el cáncer

La terapia convencional para cánceres está basada en la extirpación quirúrgica del tumor, quimioterapia que incluye drogas que promueven efectos tóxicos selectivos sobre las células tumorales en división y también la irradiación localizada con rayos gamma. Sin embargo, a pesar de estos tratamientos convencionales, a menudo las células tumorales no son eliminadas por completo y a pesar de los tratamientos, estas forman nuevos focos tumorales causando finalmente el avance del cáncer, lo que conlleva una drástica baja en la calidad de vida y productividad y, en último término, la muerte de los pacientes. La terapia biológica para combatir tumores, que ha

mostrado tener una mayor eficacia que las terapias convencionales, ha sido introducida relativamente reciente en los países desarrollados (Prieto *et al.*, 2004).

La respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T CD8+ y CD4+ efectores específicos puede evitar el inicio o la progresión del cáncer. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos tienen el potencial de eliminar específicamente las células que expresan antígenos tumorales, que son selectivamente sobre expresados en las células tumorales y que están ausentes, o presentes en muy bajas cantidades en células normales. De hecho, la infiltración de linfocitos T citotóxicos en tumores se asocia a menudo con parámetros clínicos favorables como recurrencia disminuida de la enfermedad y mayor supervivencia en pacientes con distintos tipos de cáncer (Dudley *et al.*, 2002; Mahmoud *et al.*, 2011). La inmunoterapia antitumoral aprovecha la capacidad del sistema inmune para eliminar las células tumorales y es una alternativa altamente atractiva para generar una protección de larga duración contra el cáncer sin los efectos secundarios de las terapias convencionales que muchas veces son devastadoras para la calidad de vida del paciente.

Las estrategias inmunoterapéuticas utilizadas hasta ahora para combatir el cáncer pueden ser clasificadas según sean específicas e inespecíficas. Las estrategias específicas pueden definirse como los tratamientos estratégicos que persiguen establecer una respuesta inmune dirigida específicamente contra antígenos del tumor previamente identificados (como por ejemplo, transferencia adoptiva de células T antígeno-específicas, anticuerpos específicos contra blancos tumorales, estimulación con células dendríticas (DCs) cargadas de antígenos tumorales, etc.), y deben ser distinguidas de las inmunoterapias inespecíficas (incluyendo citoquinas o inmunoestimulantes), las cuales manipulan la respuesta inmune sin considerar antígenos específicamente expresados en el tumor. Las estrategias inespecíficas, además de caras, pueden resultar peligrosas debido a los diversos efectos colaterales que pueden eventualmente desencadenar, incluyendo entre otros, respuestas autoinmunes. Por lo tanto, el tipo de inmunoterapia más promisorio en cuanto a su eficacia y costo económico, es la específica.

El año 2010 la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) aprobó en USA la primera inmunoterapia específica comercializable, *Provenge* de Dendreon corporation

(<http://www.dendreon.com/products/provenge/>), la cual utiliza células autólogas presentadoras de antígeno en combinación con un antígeno asociado a cáncer de próstata para el tratamiento de esta enfermedad. A nivel nacional, el grupo pionero de científicos de Oncobiomed, liderados por el Dr. Flavio Salazar, en conjunto con la Universidad de Chile, ha implementado actualmente TAP cells, la primer inmunoterapia específica nacional que se encuentra en fase de ensayos clínicos, la cual va dirigida a tratar pacientes con melanoma (<http://www.oncobiomed.cl/>). Esta terapia se basa en la utilización de DCs autólogas del paciente en conjunto con una mezcla de antígenos tumorales proveniente de melanomas de 3 orígenes distintos.

2.4 Antígeno carcinoembrionario (CEA)

Los antígenos tumorales son moléculas expresadas selectivamente, pero no necesariamente de forma exclusiva, en los tumores, y ausentes o expresadas en muy bajos niveles en el tejido sano correspondiente (Farkas y Finn, 2010). Esta expresión exclusiva o selectiva es lo que permite que el sistema inmune monte una respuesta específica sin dañar los tejidos sanos. Dentro de los antígenos tumorales descritos hasta ahora para cánceres del aparato digestivo, el antígeno carcinoembrionario ("*Carcinoembryonic antigen*", CEA) es el que mejor representa estas características. Su nombre se debe a que inicialmente fue detectado solo en tumores y tejido embrionario, aunque posteriormente fue también detectado en muy bajos niveles en algunas células epiteliales del tracto gastrointestinal de adultos sanos (Hammarstrom, 1999; Bannura *et al.*, 2004). Concretamente, CEA es detectado en el 95,5% de los pacientes con cáncer colorrectal (Tsouma *et al.*, 2010), 89% de los casos de cáncer de vesícula biliar (Roa *et al.*, 1992) y 37% de los pacientes con cáncer gástrico (Qiu *et al.*, 2010). A la inversa, este antígeno es detectado levemente en tan solo una pequeña fracción de la población sana (7.5 - 12%). Incluso, la detección de este antígeno en el suero es utilizada para el pronóstico de cánceres del sistema digestivo y los niveles elevados se correlacionan con la metástasis de estos (Bannura *et al.*, 2004; Lopez, 2005). Así, este antígeno ha sido clasificado como uno de los 15 antígenos más prioritarios para utilizar como blanco molecular de entre los antígenos tumorales descritos para

todos los cánceres (Cheever *et al.*, 2009). Esta priorización de antígenos tumorales se realizó mediante el análisis de diversos estudios donde se consideró, entre otras características, la capacidad terapéutica, inmunogenicidad, oncogenicidad y especificidad. Así, todos estos antecedentes hacen de CEA, una excelente opción para dirigir una inmunoterapia específica para el tratamiento de cánceres del sistema digestivo.

Debido a esto proponemos desarrollar una inmunoterapia contra CEA para ser usada en pacientes con cánceres de vesícula, gástrico y colorrectal. No obstante, aunque CEA no es expresado en el 100% de los pacientes con estos cánceres, de obtener buenos resultados con la realización de este proyecto, la metodología propuesta aquí nos permitiría realizar en el futuro terapias equivalentes pero contra otros antígenos que, junto a CEA, cubran un amplio espectro de pacientes con estos tipos de cánceres.

2.5 Inmunoterapias específicas activas desarrolladas contra cánceres del aparato digestivo

La inmunoterapia específica activa o vacunas antitumorales buscan estimular el sistema inmune del paciente *in vivo* para inducir respuestas endógenas de linfocitos T específicos. La principal ventaja de las vacunas contra el cáncer es la posibilidad de conferir respuestas de linfocitos antitumorales de memoria a un bajo costo. A pesar de los alentadores resultados obtenidos en modelos preclínicos, muy pocos estudios usando vacunas antitumorales han demostrado una respuesta clínica objetiva (Nagorsen y Thiel, 2006; Rao *et al.*, 2011). En el año 2006 se realizó un metanálisis de 32 estudios clínicos en fase I y fase II del efecto benéfico que tenían diferentes estrategias inmunoterapéuticas específicas para el tratamiento de cáncer colorrectal, en los cuales se analizó un total de 527 pacientes (Nagorsen y Thiel, 2006). Este metanálisis mostró que las vacunas que han utilizado tumores autólogos y las inmunoterapias basadas en células dendríticas (DCs) han sido los dos tipos de inmunoterapias más exitosas en cuanto a manifestar activación de la respuesta inmune específica. Concretamente, se observó que el 59% de los casos analizados manifestaron activación de la respuesta inmune humoral

antitumoral, mientras que el 44% mostró estimulación de la respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T.

Sin embargo, a pesar de las alentadoras cifras mostrando activación de la respuesta inmune adaptativa antitumoral, tan solo el 0.9% de los casos analizados mostraron algún grado de beneficio a nivel clínico (respuestas completas o parciales). Un metanálisis más reciente (Rao *et al.*, 2011) realizado a partir de 43 estudios clínicos para probar la efectividad de diferentes inmunoterapias específicas basadas principalmente en DCs cargadas de antígenos tumorales, tumores autólogos, virus expresando antígenos tumorales y anticuerpos anti idiotipos, entre otras, ha arrojado resultados similares al metanálisis anteriormente realizado en 2006. En este nuevo metanálisis publicado en 2011 se muestra que la efectividad clínica de las diferentes estrategias inmunoterapéuticas utilizadas en un total de 656 pacientes con cáncer colorrectal avanzado fue del 1.68% (Rao *et al.*, 2011). Similarmente, estudios clínicos o preclínicos han mostrado baja efectividad de inmunoterapias activas específicas en la reversión total o parcial de otros cánceres del sistema digestivo (Takeda *et al.*, 2010; Strohlein *et al.*, 2011). La baja efectividad de estas terapias en inducir una mejora significativa de la enfermedad es probablemente debida al apagamiento de la respuesta inmune específica por parte del tumor y de células supresoras infiltradas.

2.6 Terapias adoptivas de linfocitos T antitumorales

A diferencia de las inmunoterapias específicas activas, la inmunoterapia específica pasiva tiene como objetivo proporcionar exógenamente a los pacientes las células y moléculas efectoras previamente manipuladas *ex vivo* en el laboratorio. La terapia adoptiva o administración de linfocitos T antitumorales ha demostrado su potencial para eliminar tumores y prevenir su recurrencia en modelos animales (Amedei *et al.*, 2011). En ensayos clínicos, la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos específicos aislados de biopsias de tumores y amplificados *in vitro*, ha demostrado ser eficaz en el control de la enfermedad en pacientes con melanoma

metastásico, neuroblastoma o tumores por infecciones virales, proporcionando así pruebas directas de la eficacia de los linfocitos T citotóxicos como inmunoterapia antitumoral (Dudley *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2008; Pule *et al.*, 2008; Amedei *et al.*, 2011). La principal limitación de esta estrategia es la necesidad de obtener una biopsia de los pacientes que permita extraer una cantidad suficiente de linfocitos antitumorales para ser expandidos *ex vivo*. Además, existe la dificultad técnica de identificar y expandir los linfocitos T con especificidad antitumoral debido al limitado número de antígenos actualmente descritos para los distintos tipos de tumores (con la excepción del melanoma).

La modificación genética de los linfocitos con “receptores de células T” (TCR) que reconocen antígenos tumorales ha sido desarrollada con el fin de superar la necesidad de aislar una cantidad suficiente de linfocitos T desde biopsias. Esta metodología permite cambiar la especificidad de linfocitos al introducirles genéticamente un TCR aislado de un clon de linfocito T previamente caracterizado como antitumoral para que el linfocito T modificado sea capaz de atacar células cancerosas (Zhang y Morgan, 2011). La modificación genética de linfocitos T se hace a través de un retrovirus (gammaretrovirus o lentivirus, dependiendo del modelo biológico) el cual inserta establemente ambas cadenas α y β del TCR en el genoma del linfocito T. A pesar del riesgo de posibles mutaciones asociado con la inserción retroviral, no se han reportado eventos adversos relacionados con su uso en linfocitos T. Algunos estudios clínicos han usado esta estrategia en pacientes con melanoma metastásico demostrando su seguridad (Park *et al.*, 2011).

Se han empleado TCRs específicos para los antígenos MART-1 y gp-100 que son altamente expresados en células de melanoma y en menor grado en melanocitos (Morgan *et al.*, 2006). En estos estudios se observó que la administración de linfocitos T genéticamente modificados puede inducir la regresión o estabilización del tamaño tumoral en una proporción variable de los pacientes (12-30%), además de efectos adversos debido al ataque de melanocitos normales que también expresan estos antígenos.

A pesar de los resultados clínicos promisorios, existen varias desventajas asociadas a la utilización de linfocitos T modificados genéticamente con TCRs. Primero, las cadenas α y β del TCR introducido compiten con las cadenas α' y β' del TCR' endógeno preexistente, lo que se traduce por un lado en la disminución de la densidad de TCRs antitumorales y por otro lado la generación de TCRs con especificidades desconocidas (α/β' y α'/β) potencialmente riesgosas (Sommermeier *et al.*, 2006; Hart *et al.*, 2008). Segundo, dado que el TCR reconoce específicamente a un complejo formado por el péptido antigénico alojado sobre una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), la cual es altamente polimórfica, un TCR en particular sólo sirve para aquella fracción de los pacientes que expresen la molécula de CMH reconocida por el TCR transgénico. Por último, muchos tumores disminuyen la expresión de las moléculas de CMH como un mecanismo de evasión al reconocimiento por parte de los linfocitos T (Seliger, 2005).

2.7 Terapias adoptivas con linfocitos T modificados con receptores quiméricos antitumorales

Una estrategia que está revolucionando el campo de la inmunoterapia es la modificación genética de linfocitos T CD4+ y CD8+ con “receptores de antígeno quiméricos” (“*Chimeric antigen receptors*”, CARs), los cuales son moléculas de cadena única híbridas cuyos sitios de reconocimiento de antígeno provienen de un anticuerpo y los dominios intracelulares de transducción de señales provienen del TCR. Esta cadena única está conformada por los fragmentos variables (V) de las cadenas pesadas (H) y livianas (L) de un anticuerpo (“*Single chain variable fragment*”, scFv), seguido por una secuencia espaciadora fusionado con dominios transmembrana y citoplasmáticos de señalización de moléculas coestimuladoras (como CD27, CD28, OX40 y 4-1BB) y de CD3 ξ (Fig. 2) (Cartellieri *et al.*, 2010). Una vez que los fragmentos scFv del CAR reconocen su antígeno blanco, se inicia la transducción de señales al interior de los linfocitos T, de forma similar como ocurriría a través del TCR, lo que desencadena su activación y adquisición de su fenotipo efector que incluye secreción de citoquinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α , además de la liberación de mediadores citotóxicos como perforina y granzima que

culminan con la destrucción de la célula blanco. En consecuencia, utilizando scFv apropiados, los linfocitos T genéticamente modificados con CARs reconocerían los antígenos presentes en la superficie de las células tumorales y de manera independiente de la presencia de moléculas de CMH. Así, una construcción de CAR podría ser usada en cualquier paciente, independiente de su CMH (haplotipo). Además, al estar formado por una cadena única los CARs no compiten con los TCRs endógenos preexistentes. Por lo tanto, la modificación genética de linfocitos T con CARs superan las limitaciones asociadas con el uso de TCRs y representa una estrategia tremendamente promisoría.

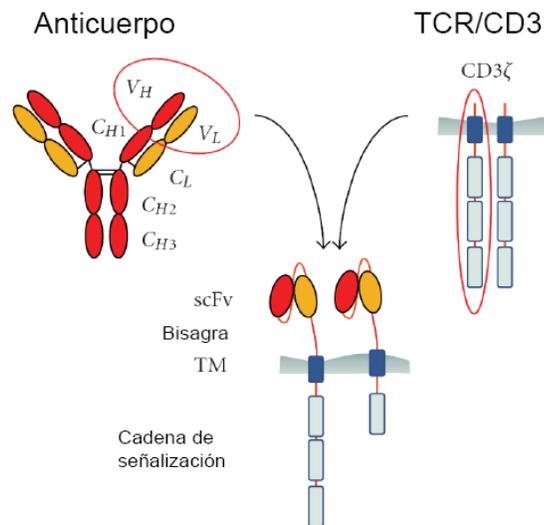


Figura 2. Esquema de la arquitectura básica de los Receptores de Antígeno Quiméricos (Adaptado de (Cartellieri *et al.*, 2010)).

Inicialmente, los CARs generados con solo un dominio de señalización correspondiente a CD3 ζ mostraron inducir una proliferación transitoria de los linfocitos T transducidos y una secreción de citoquinas subóptima, por lo que no podían promover una respuesta antitumoral prolongada *in vivo* (Cartellieri *et al.*, 2010; Jena *et al.*, 2010). Al introducir un dominio de señalización de coestimulación (CD28) en el sector intracelular de los CARs de segunda generación se logró promover una secreción mayor de citoquinas efectoras y una proliferación

prolongada en los linfocitos transducidos. Además, la señalización vía CD28 promueve un aumento en los niveles de moléculas antiapoptóticas, lo cual inhibe la muerte celular inducida por activación (*activation-induced cell dead*, AICD), así logrando una mayor persistencia *in vivo* de los linfocitos T modificados y una respuesta antitumoral más eficiente (Fig. 3). Actualmente se han generado los CARs de tercera generación (Fig. 3), a los cuales, además del dominio de CD3 ζ , se les ha añadido un segundo dominio de señalización de coestimulación, lo cual ha resultado en un aumento significativo en la secreción de citoquinas efectoras, proliferación, inhibición de la AICD y persistencia de las células transducidas *in vivo*, lo cual ha resultado en una respuesta antitumoral más eficaz (Cartellieri *et al.*, 2010; Jena *et al.*, 2010). Esto ha llevado a diferentes grupos de investigación a realizar estudios clínicos. En contraste a la baja efectividad de las inmunoterapias activas para evitar la recidiva del cáncer (Nagorsen y Thiel, 2006; Rao *et al.*, 2011), una eficacia notablemente superior se ha visto en la utilización de linfocitos T que expresan CARs como aproximación inmunoterapéutica para el tratamiento de leucemia, neuroblastoma y melanoma (Morgan *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Pule *et al.*, 2008; Till *et al.*, 2008; Cartellieri *et al.*, 2010; Kalos *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011).

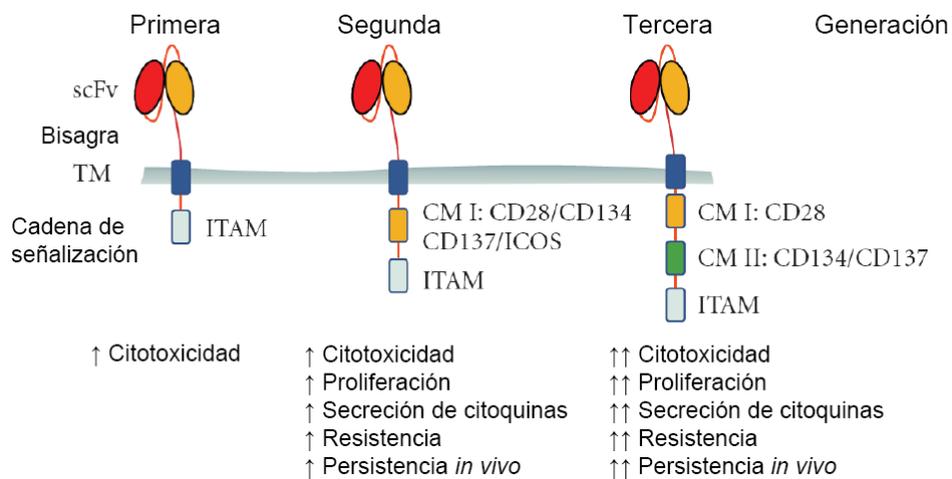


Figura 3. Evolución de la capacidad de señalización de los CARs. La adición de moléculas coestimuladoras a misma cadena única de la construcción permite la transducción de señales de persistencia y aumentada citotoxicidad (Adaptado de (Cartellieri *et al.*, 2010)).

Concretamente, en un estudio realizado con 15 pacientes con melanoma, el tratamiento con la aproximación de células T autólogas expresando CARs mostró la regresión de focos metastásicos en 2 pacientes (Morgan *et al.*, 2006). Otro estudio reciente que ha usado esta aproximación inmunoterapéutica, mostró que linfocitos T modificados con un lentivirus portador de un CAR específico contra la proteína CD19 expresada en linfocitos B normales y malignos fueron efectivos en pacientes con leucemia linfocítica crónica. Estos estudios demostraron la capacidad de esta estrategia para eliminar grandes números de células cancerosas, donde dos de los tres pacientes tratados mostraron una regresión completa de la carga tumoral (Kalos *et al.*, 2011). Estos resultados fueron obtenidos a pesar de la muy baja tasa de transducción de linfocitos T (10%), planteando la interrogante de si el uso de protocolos de transducción más eficientes se verá reflejado en un mayor grado de eficacia de este tipo de inmunoterapias. Similarmente, en otro estudio realizado con 8 pacientes con linfoma de células B, el tratamiento con esta inmunoterapia resultó en la remisión completa en 2 pacientes, otro con remisión parcial y 4 pacientes con estabilización de la enfermedad (Till *et al.*, 2008). Otro estudio también ha utilizado esta aproximación terapéutica en pacientes con neuroblastoma, en el cual 4 de 8 pacientes mostraron regresión parcial o total del tumor (Pule *et al.*, 2008).

Además de la alta eficacia terapéutica que se ha visto en estos estudios, la utilización de esta estrategia ha mostrado ser bien tolerada por los pacientes estudiados. Así, la utilización de linfocitos T autólogos expresando CARs específicos para antígenos tumorales resulta ser una estrategia inmunoterapéutica promisorio para combatir la recidiva de cánceres del sistema digestivo como terapia adyuvante. Así, en general los estudios clínicos en que han utilizado inmunoterapias basadas en CARs han mostrado un beneficio clínico en alrededor el 50% de los pacientes tratados (Pule *et al.*, 2008; Till *et al.*, 2008; Kochenderfer *et al.*, 2010; Kalos *et al.*, 2011).

Una característica clave de los linfocitos T corresponde a su capacidad de persistir en el organismo y responder a exposiciones sucesivas del antígeno en particular. Este fenómeno ocurre gracias a que, después de que han sido activados por el reconocimiento de sus antígenos

específicos, la población de linfocitos T se contrae (apoptosis) y algunos de ellos (5-10%) cambian su expresión génica adquiriendo un fenotipo de memoria. Este nuevo fenotipo adquiere una reorganización de la maquinaria efectora y de moléculas adaptadoras de la señalización, las cuales hacen a las células T más sensibles a la activación al reconocer el antígeno y más potentes en cuanto a la función efectora desencadenada. Al igual que la activación mediada por el reconocimiento de su antígeno, la activación mediada por estimulación con anticuerpos anti CD3 y CD28 utilizada en la mayoría de los protocolos de transducción induce el programa de muerte celular inducida por activación (AICD) en cierta población de los linfocitos T, además de su diferenciación hacia linfocitos efectores con poca capacidad de persistir en el organismo, la cual se ve aumentada mientras mayor es el tiempo de cultivo de los linfocitos T *in vitro*. Se estima que la principal limitación de las inmunoterapias adoptivas es la baja capacidad de los linfocitos T para renovarse a sí mismos y persistir como una población de memoria.

Hoy en día sigue siendo necesario llevar a cabo estudios acuciosos en humanos, que nos permitan tener pruebas inequívocas de la eficacia y seguridad de estas inmunoterapias, más allá de los casos clínicos aislados. En este contexto, los mayores obstáculos que deben ser sorteados para desarrollar todo el potencial de esta tecnología son la baja eficiencia de transducción/expresión de los transgenes con los vectores retrovirales, además de los largos períodos de cultivo *in vitro* contemplados en los protocolos actualmente en uso, lo que disminuye su capacidad para persistir *in vivo*. El desarrollo de esta tecnología permitirá un mayor grado de eficacia de este tipo de inmunoterapias.

Hoy en día sigue siendo necesario llevar a cabo estudios acuciosos en humanos, que nos permitan tener pruebas inequívocas de la eficacia y seguridad de estas inmunoterapias, más allá de los casos clínicos aislados. En este contexto, el mayor obstáculo que debe ser sorteado, además de nuestro limitado entendimiento de la fisiopatología de muchas enfermedades, es la baja eficiencia de transducción y expresión *in vivo* de transgenes con los vectores actualmente utilizados, lo que se ha reflejado en la baja tasa de casos clínicos exitosos.

2.8 Retrovirus

La familia de los retroviridae se compone de 7 géneros según la estructura de su genoma y su secuencia de ácidos nucleicos, quedando agrupada en alpharetrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus, epsilonretrovirus, lentivirus y virus espumoso. De estos, los más utilizados en terapia génica son los lentivirus y los gammaretrovirus, también llamados retrovirus clase C, tienen un genoma monocatenario, lineal, dimérico de ARN sentido, de aproximadamente 8,3 kilo bases (kb).

Los retrovirus pueden encontrarse en un amplio rango de organismos dentro del reino animal. Es posible encontrar variantes replicativas como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o formas no replicativas que han sustituido algunos genes virales por secuencias oncogénicas (Rosenberg y Jolicoeur, 1997). El virión retroviral es de forma esférica, de 80 a 100nm de diámetro, delimitado por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de las células infectadas, en la que se insertan las proteínas de su envoltura viral “*env*”. La estructura interna del virión se compone principalmente de los productos del gen viral “*gag*”, dos copias idénticas de una molécula de ácido ribonucleico (ARN) sentido, que lo convierten en una entidad pseudo diploide, un partidor de ARN de transferencia (ARNt) para iniciar la transcripción inversa, bajas cantidades del producto del gen viral “*pol*” y en algunos casos, otras proteínas derivadas de la célula infectada (Franke *et al.*, 1994). Por lo tanto, la estructura más sencilla de un retrovirus está compuesta por los elementos *gag*, *pol* y *env*. (Figura 4).

Los virus más complejos tienen además genes que codifican otras proteínas encargadas de regular la replicación viral o de modular la respuesta del hospedero a la infección, como es el caso del virus VIH (von Schwedler *et al.*, 2003).



Figura 4. Esquema de la estructura y componentes básicos de un virión o partícula retroviral.

La simplicidad del genoma retroviral y el tipo de ciclo viral que utiliza han convertido a los retrovirus en un modelo atractivo para utilizar como vector de transferencia génica. Poseen la capacidad de copiar su genoma de ARN en una doble hebra de ácido desoxirribonucleico (ADN) que luego es integrada en el genoma de la célula infectada constituyendo el llamado provirus, el cual es transcrito por la célula hospedera dando origen a los ARN mensajeros (ARNm) que codifican las proteínas virales y el ARN genómico que es luego empaquetado en viriones. La organización de estas unidades es tal que los elementos *cis* (secuencias con función biológica en su forma de ácido nucleico) prácticamente no se superpone con los elementos *trans* (secuencias que codifican proteínas) (Anson, 2004).

El genoma de los retrovirus puede ser modificado para que porte material genético exógeno y para alterar su capacidad replicativa. En su forma de provirus pueden ser aislados e insertados en vectores de clonación para su posterior manipulación. Los vectores retrovirales son ampliamente utilizados en terapia génica, ya que son capaces de insertar su genoma de manera estable en diversos tipos celulares e incluso en líneas germinales. (Hu y Pathak, 2000; Biasco *et al.*, 2011).

2.9 Transferencia génica mediada por gammaretrovirus

En terapia génica, los retrovirus deben ser modificados para eliminar su capacidad de autorreplicación y así evitar la producción de más partículas retrovirales por parte de las células ya transducidas. Para lograr esto, los elementos *cis* (la señal de empaquetamiento, de transcripción e integración) son introducidos en un vector de transferencia, mientras que los elementos *trans* son expresados en sistemas de expresión plasmidio. De esta manera, las secuencias de ARN genómico que codifican los elementos *cis* son las únicas que serán empaquetadas en viriones y ningún gen viral (*gag*, *pol*) será transferido a las células transducidas con las partículas virales resultantes.

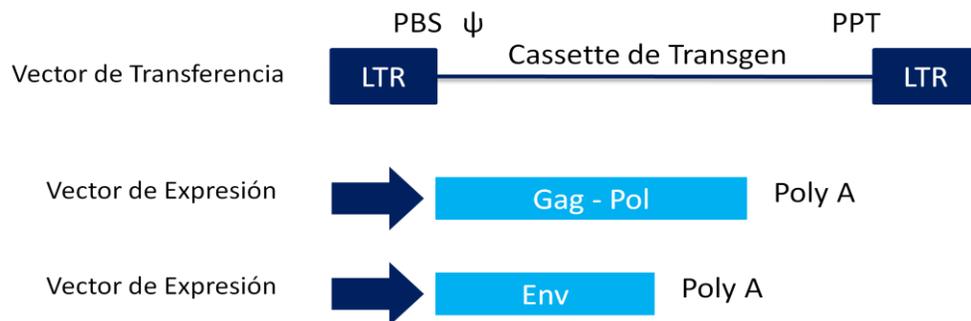


Figura 5. Separación de los elementos *cis* (en celeste) y *trans* (en azul) en un sistema de vector retroviral no replicativo. PBS (secuencia de unión a partidor), PPT (tracto de polipurina) utilizado como partidor para la síntesis de ADN, “ ψ ” (señal de empaquetamiento). El virus recombinante es producido al introducir estos 3 elementos a una misma célula.

El primer paso para la producción de viriones es la transfección de células empaquetadoras con los tres plásmidos complementarios necesarios para generar partículas virales: (i) un plásmido que codifique para la maquinaria enzimática retroviral (*Gag-pol*), (ii) un plásmido que codifique para la envoltura proteica que determinará el tropismo del virus (*Env*), y

(iii) un plásmido que codifique para nuestro gen de interés inserto en un vector retroviral compatible (en este caso, CAR-OX40 o CAR-CD28).

Una vez transcritos los plásmidos en estas células, el ARN viral es encapsulado y las partículas retrovirales son liberadas desde la célula empaquetadora al medio de cultivo sin lisarlas. El sobrenadante de estas células transfectadas transitoriamente es utilizado para la transducción de linfocitos T murinos. Luego de la infección, el ARN viral es transcrito inversamente y el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) flanqueado por las secuencias de repetición terminal larga (“Long terminal *repeat*”, LTR) se integra en el genoma de los linfocitos. Sin embargo, como el vector no posee las proteínas virales, es incapaz de replicarse (Lee *et al.*, 2009). Una vez integrado el transgén, el CAR es expresado en la superficie de los linfocitos T. Cuando el CAR se une al antígeno presente en la superficie de la célula tumoral, se gatilla la activación del linfocito T y la adquisición de su función efectora que en el caso de linfocitos T CD4+ es principalmente la secreción de citoquinas, y en el caso de linfocitos T CD8+ es la liberación de mediadores citotóxicos para eliminar las células blanco.

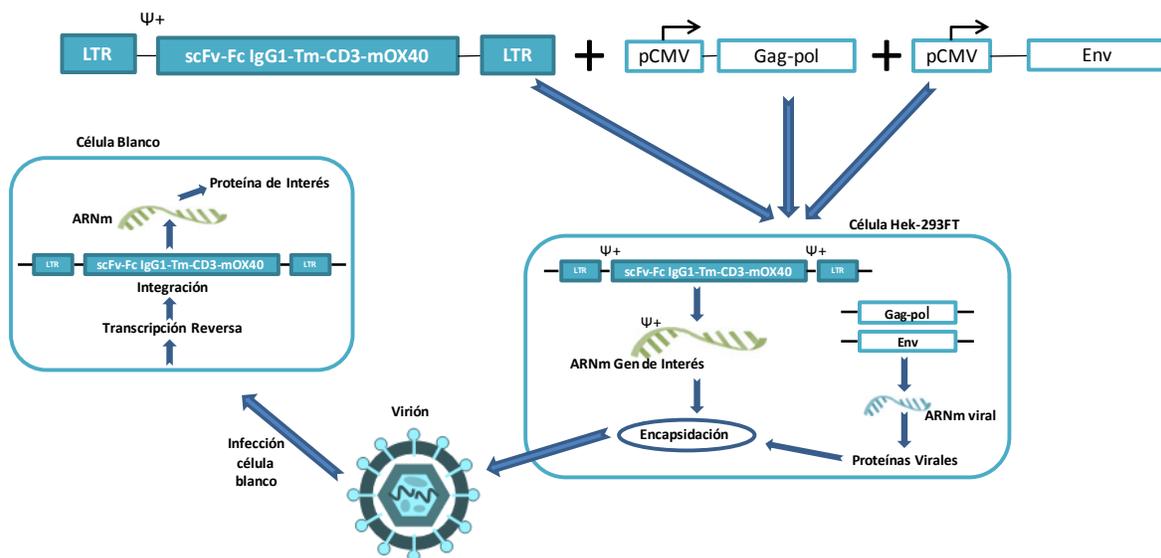


Figura 6. Esquema de la producción de viriones no replicativos mediante transfección de plásmidos codificantes para su estructura, en células empaquetadoras.

3 HIPOTESIS

“La tasa de transducción de linfocitos T con vectores gammaretrovirales puede aumentarse al modificar las variables tiempo de activación de linfocitos T y tiempo de toma de sobrenadante viral”.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el protocolo de transducción de linfocitos T murinos más eficiente utilizando gammaretrovirus como vector de transferencia génica.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener y amplificar los plásmidos correspondientes a la envoltura (*env*), maquinaria enzimática (*gag-pol*) y el transgén de interés (CAR) mediante transformación bacteriana, necesarios para la producción de partículas retrovirales.
2. Producir partículas retrovirales mediante transfección de células HEK 293T como línea empaquetadora con los plásmidos obtenidos en el objetivo anterior.
3. Comparar la eficiencia de transfección de la línea celular empaquetadora mediante lipofectamina y cloruro de calcio.
4. Evaluar la eficiencia de transducción de linfocitos T comparando la eficiencia del sobrenadante viral obtenido a 24, 48, y 72h posteriores a la transfección.
5. Evaluar la eficiencia de transducción de linfocitos T comparando distintos tiempos de activación de los linfocitos T previo a la transducción.
6. Evaluar la expresión del CAR a distintos tiempos luego de la transducción.
7. Evaluar la eficiencia de transducción de linfocitos T comparando el uso de polibreno y retronectina como agentes de la transducción.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Identificación y amplificación de plásmidos

Los plásmidos fueron obtenidos a partir de papel filtro Whatman embebido en una solución del plásmido diluido en buffer Tris EDTA (TE). Una vez recuperados, se transformaron bacterias de la especie *Escherichia coli* quimiocompetentes, cepa NovaBlue con cada uno de los plásmidos para su amplificación. Para la extracción de los plásmidos se utilizó el sistema de Midiprep por columnas de purificación (AxyPrep™ Plasmid Midiprep Kit, Axygene Bioscience). La cuantificación espectrofotométrica de las muestras se realizó en NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). Una vez purificados los plásmidos, se analizó su peso molecular mediante digestión con la enzima de restricción BamH I (Life Technologies, Invitrogen) y electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% con tinción RedGel.

5.1.1 Plásmido *gag-pol*. Se utilizó el plásmido pHIT60 que codifica las proteínas estructurales internas (Gag), la integrasa y la transcriptasa viral inversa (Pol) del virus de leucemia murino (“*Murine leukemia virus*”, MLV). Este sistema utiliza el promotor de citomegalovirus (CMV) y un origen de replicación del virus 40 de simios (“*Simian virus 40*”, SV40).

5.1.2 Plásmido *env*. Para la producción de las proteínas de la envoltura viral se utilizó el plásmido ecotrópico pVPack-Eco (Agilent Technologies). Al igual que pHIT60, este plásmido está dirigido por el promotor CMV, un origen de replicación SV40, además de una secuencia interna de entrada a ribosoma (IRES) unida río abajo de una secuencia de resistencia a ampicilina para permitir su selección en líneas estables. Posee también un origen de replicación pUC para su replicación en sistemas procariontes (Figura 7).

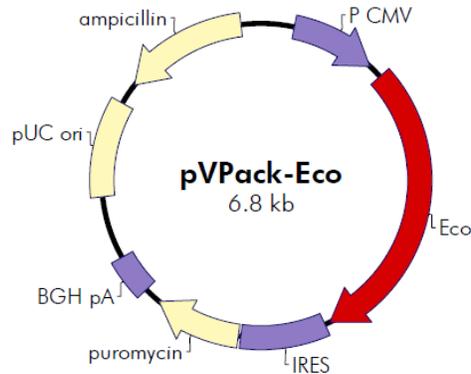


Figura 7. Mapa del vector comercial retroviral ecotrópico pVPack-Eco.

5.1.3 Plásmido CAR. Para la construcción de vectores retrovirales, se utilizaron los plásmidos pBullet-L κ -C6-B1D2-scFv-hFc-CD3- ζ -mOX40 y pBullet-L κ -C6-B1D2-scFv-hFc-CD28-CD3- ζ , (facilitados por el Dr. Hinrich Abken, Universidad de Colonia, Alemania) los cuales consisten en un dominio de reconocimiento del antígeno CEA, un dominio espaciador IgG1, y los dominios intracelulares de señalización de CD3 y CD28 u OX40, tal como se muestra en la Figura 8.

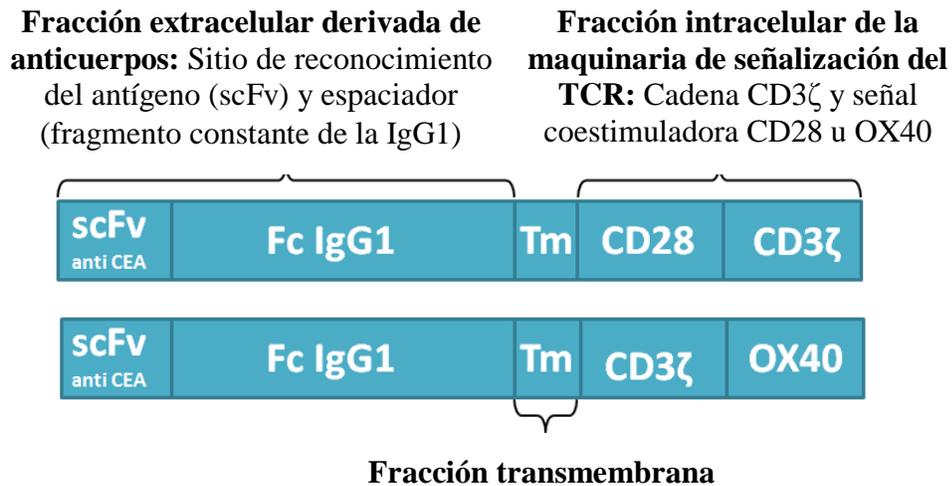


Figura 8. Esquema de la estructura de la construcción plasmidial que codifica para el receptor de antígeno quimérico. La secuencia se encuentra flanqueada por secuencias largas de repetición terminal retrovirales y controlada por el promotor CMV.

5.2 Líneas celulares y material biológico

Se usaron bazos de ratón C57BL6 (Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida) para la obtención de linfocitos T murino. Los linfocitos T murinos fueron estimulados con PHA-L (3ug/mL; SIGMA-Aldrich), anti-CD3 y anti-CD28 (100ng/mL; Biolegend), IL-2 humana (100IU/mL; Biolegend) e IL-15 murina (5ng/mL; Biolegend) por 24h y mantenidos en cultivo con IL-2 humana (25U/mL) e IL-15 murina (5ng/mL).

El medio completo de cultivo para las líneas empaquetadoras de partículas virales HEK 293T consistió en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco - Invitrogen) de alta glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina. Para los linfocitos se utilizó medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco - Invitrogen) suplementado con 10% de SBF, 1% glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato sódico, 1% de aminoácidos no esenciales Modified Eagle Medium (MEM NEA, Gibco - Invitrogen).

5.3 Producción de partículas retrovirales no replicativas

Se utilizaron células humanas HEK 293T (ATCC #CRL-1573™) como línea empaquetadora de partículas gammaretrovirales. Estas células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) con alta glucosa suplementado con 10% de SBF, 1% de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, en placas de 6 pocillos a una concentración de 4×10^5 células/pocillo. Después de un día de cultivo, fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes mediante el método de CaCl_2 . Dos horas previas a la transfección se añadió medio fresco. Se preparó una solución de HEPES-buffer salino (HBS) 2X, y por otro lado una mezcla de CaCl_2 0,25M conteniendo el plásmido que codifica la proteína de la envoltura del virus (1,5ug), el plásmido que codifica las proteínas de la maquinaria enzimática retroviral (1,5ug) y un vector gammaretroviral con el inserto del gen de interés (1,5ug). La solución de CaCl_2 conteniendo los plásmidos fue mezclada con la solución de HBS y se incubó por 20 min a

temperatura ambiente, para luego ser añadida sobre las células. Las células fueron incubadas inicialmente durante 16h a 37°C y 5% CO₂, posteriormente el medio se reemplazó por medio fresco. Las células fueron incubadas y el sobrenadante que contiene las partículas virales (Figura 9) fue recuperado a las 24 y 48h posteriores.

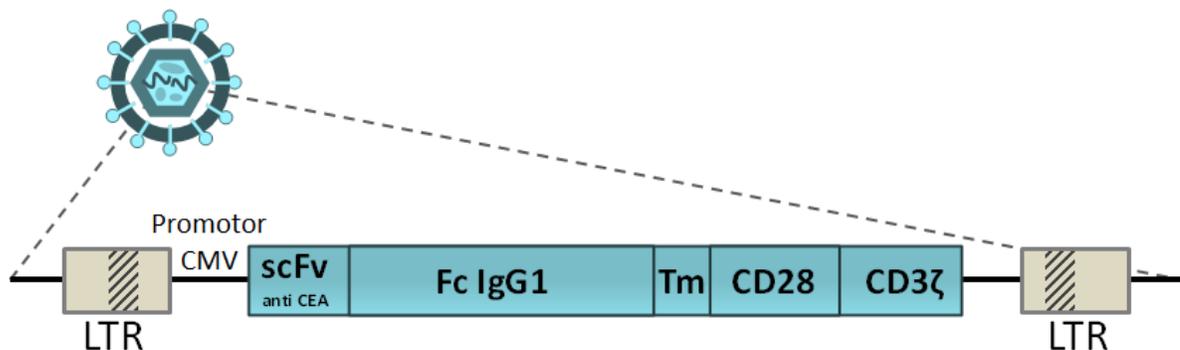


Figura 9. Estructura del genoma viral utilizado para la transducción de linfocitos T murinos que codifican el CAR anti CEA bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Se muestra el sitio de reconocimiento del CEA derivado de los fragmentos variables de un anticuerpo (scFv), el fragmento espaciador derivado de la inmunoglobulina G1 (IgG1), el dominio transmembrana (Tm), el dominio de señalización de la molécula coestimuladora CD28 y el dominio de señalización de la cadena ζ del complejo CD3.

5.4 Transducción de linfocitos T con vectores retrovirales

Los esplenocitos y linfocitos T purificados fueron cuantificados y transducidos con gammaretrovirus conteniendo el DNA que codifica para el CAR. Los linfocitos T en diferentes cantidades (entre 2×10^6 a 3×10^6 por pocillo), fueron activados con el anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28 (100ng/ml), 300 U/ml de IL-2 humana, 5ng/ml de IL-15 murina y 3 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA-L) en placas de 24 pocillos e incubados por 6, 24 o 48 horas. Para potenciar la transducción se utilizó polibreno (bromuro de hexadimetrina), un poli-cación

sintético que inhibe la repulsión de cargas entre glicoproteínas virales y membrana de la célula blanco (Davis *et al.*, 2004); y retronectina, fragmento CH-296 recombinante de la fibronectina con dominios de adhesión celular capaces de unir receptores de integrinas, y dominios de unión a heparina capaces de unirse a distintos tipos de virus facilitando la colocalización de ambos. Para el caso de las células transducidas en presencia de retronectina* (RetroNectin™), se recubrió placas de 24 pocillos con 500µl de retronectina a una concentración de 20µg/ml y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiró la solución de retronectina y se bloqueó cada pocillo con 0,5mL de PBS con 0,5% de albúmina sérica bovina (“*Bovine serum albumin*”, BSA) durante 30 minutos y se lavó con buffer HBSS (“*Hank’s balanced salt solution*”) con 2,5% de Hepes 1M. A cada pocillo se añadió 1ml de sobrenadante viral conteniendo 1×10^6 linfocitos T activados suplementados con 100 U/ml IL-2 y 5 ng/ml de IL-15 y se centrifugó a 1000 g por 90 minutos a 32° C. Al día siguiente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en sobrenadante viral fresco suplementado con 100 U/ml IL-2 y 5 ng/ml de IL-15, y centrifugadas nuevamente a 1000 g por 90 minutos a 32° C. Luego de ser transducidos, los linfocitos T fueron mantenidos en cultivo durante 2 o 3 días.

5.5 Determinación del porcentaje de linfocitos T transducidos

Los linfocitos T transducidos fueron recuperados desde las placas de 24 pocillos, centrifugados 5 minutos a 300g y resuspendidos en PBS a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células por mL, de los cuales se tomó 600µl por cada tratamiento en tubos de 1,5mL. Los tubos se centrifugaron 5 minutos a 300g y se resuspendieron en 300µl de PBS con SFB al 2% los cuales fueron divididos en dos tubos de 1,5mL (150µl para evaluar la expresión del CAR y 150µl para el control de isotipo). Se agregó 0,3µl de anti CD3-APC/Cy7 y 0,3µl de anti CD8-PerCP a cada tubo; 0,3µl de anti IgG1-APC a las alícuotas para evaluar la expresión del CAR y 0,3µl de IgG1-APC de igual isotipo, pero de especificidad desconocida, para las alícuotas correspondientes al control de isotipo. Se incubaron a 4° C por 30 minutos y se lavaron dos veces con PBS con SFB al 2%. Luego se centrifugaron a 300g por 5 minutos, se resuspendieron en 300µl de PBS con formaldehído al 2% y se almacenaron a 4° C en ausencia de luz hasta su análisis por citometría

de flujo (citómetro FACSCanto II, Becton Dickinson, Estados Unidos; programa de análisis de datos FlowJo v8.7, Tree Star Inc., Estados Unidos)

6 PRESENTACION DE RESULTADOS

6.1 Obtención de plásmidos Env, Gag-pol y CAR

El primer objetivo planteado fue la obtención de plásmidos para la producción de partículas retrovirales. Luego de su introducción en bacterias quimiocompetentes, su amplificación y extracción, los plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción de corte único BamH I para estimar su peso molecular, y de esta manera comprobar su integridad para ensayos posteriores.

Cuadro 1. Pesos moleculares de los plásmidos utilizados para la generación de partículas retrovirales.

Plásmido	Peso molecular
Gag-Pol	12.394pb
Env	6.800pb
CAR-OX40	7.399pb
CAR-CD28	7.414pb

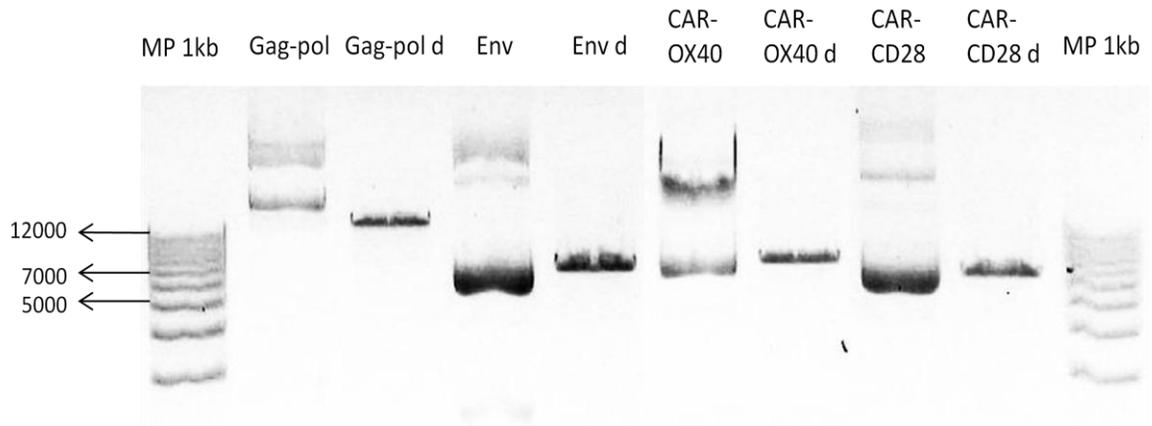


Figura 10. Plásmidos para producción de viriones. Se muestra un gel al 0,8% de agarosa teñido con *RedGel*. Las muestras fueron digeridas durante 1h a 37° C con la enzima de restricción BamH I. Las muestras digeridas están indicadas con la letra “d”. En los carriles de muestras no digeridas se observan, de arriba hacia abajo, bandas correspondientes al plásmido circular y súper-enrollado. Los pesos moleculares de cada plásmido corresponden a los listados en el Cuadro 1.

6.2 Transfección de células HEK 293T con lipofectamina *versus* CaCl₂

El siguiente paso para la producción de partículas retrovirales, fue la transfección de células empaquetadoras HEK 293T con los plásmidos purificados. En los sucesivos ensayos realizados, se observó **XXXXXX**

Las células HEK 293T son células de origen humano, por lo que las partículas retrovirales ecotrópicas producidas no son capaces de infectarlas. Esto asegura que el porcentaje de transfección observado corresponde netamente al generado por la transfección de las células y no a la posible transducción.

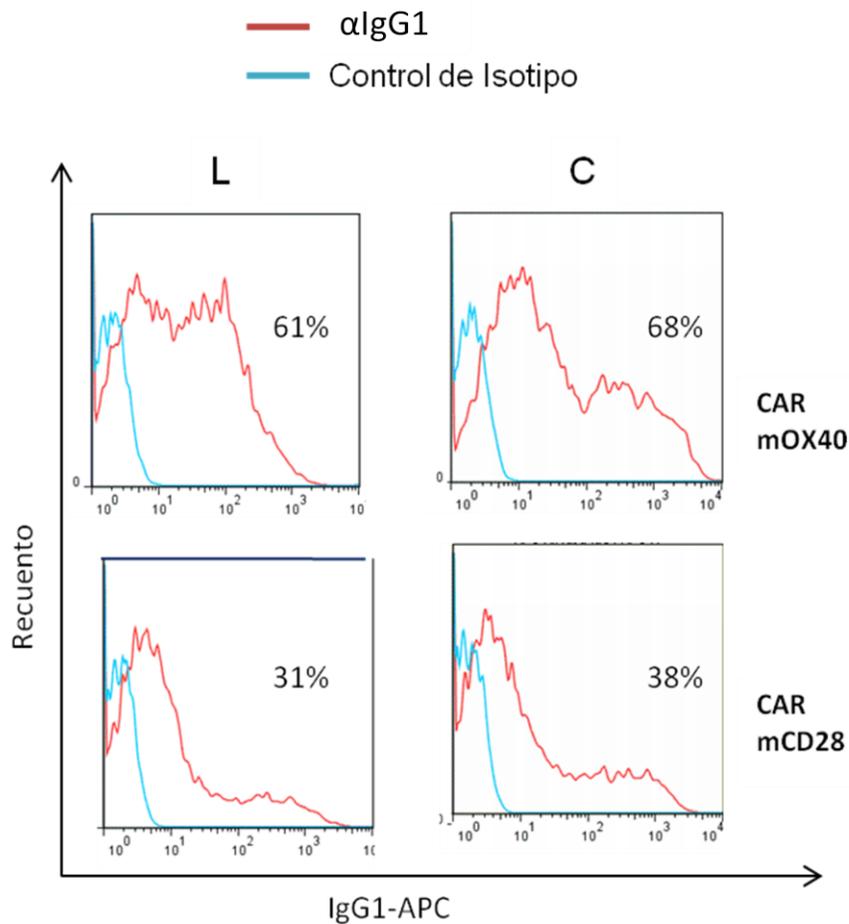


Figura 11. Primer ensayo de transfección. Análisis por citometría de flujo de la expresión de los CARs en células HEK 293T. La figura muestra histogramas de la eficiencia de la transducción junto a su respectivo porcentaje de células transducidas. La columna “L” representa los tratamientos de transfección con lipofectamina, mientras que la columna “C” representa los tratamientos de transfección con cloruro de calcio, ambos utilizando 1 μ g de cada plásmido. La lectura de resultados se realizó a las 24 horas posteriores a la transfección.

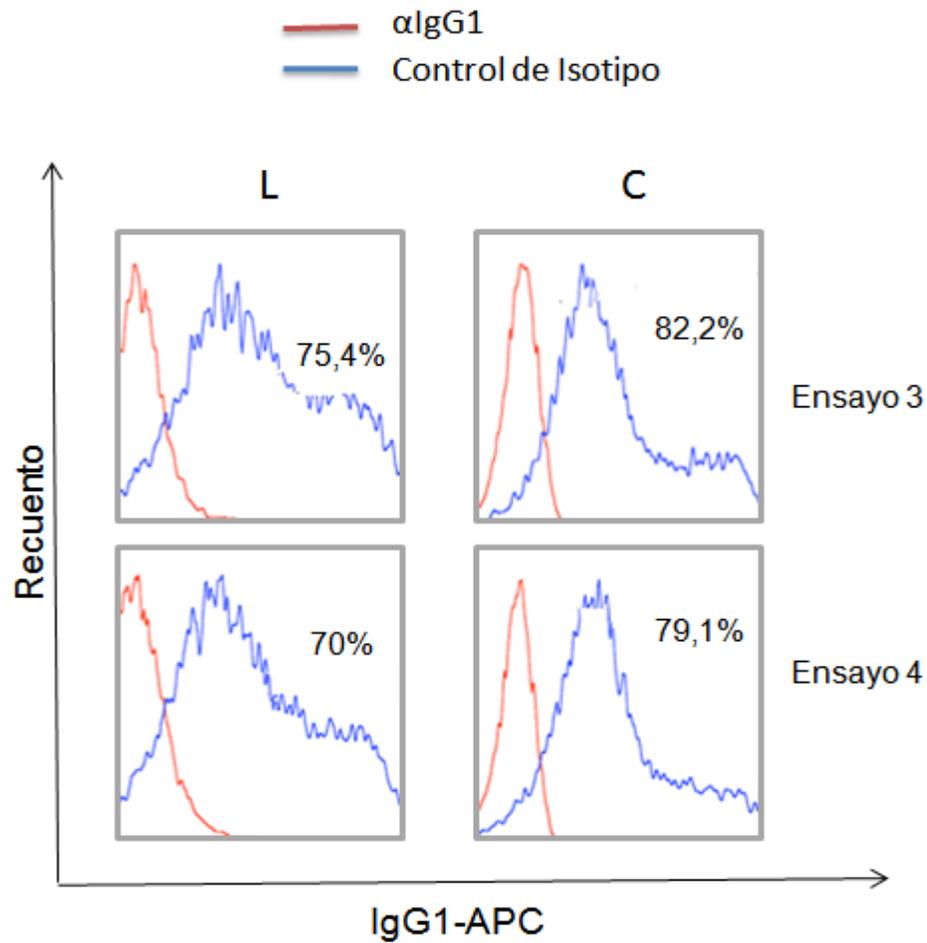


Figura 12. Segundo ensayo de transfección. Comparación de la eficiencia de transfección utilizando la técnica de cloruro de calcio y lipofectamina. La figura muestra histogramas de la eficiencia de la transducción junto a su respectivo porcentaje de células transducidas. La columna “L” representa los tratamientos de transfección con lipofectamina, mientras que la columna “C” representa los tratamientos de transfección con cloruro de calcio. En rojo se observa el control de isotipo de la muestra, en azul se observa la población celular positiva para IgG1. Se utilizó 1,5 μ g de cada plásmido y se analizó mediante citometría de flujo a las 48 horas posteriores a la transfección.

6.3 Transducción de Linfocitos T

Una vez obtenidos los sobrenadantes virales, éstos fueron utilizados para transducir un cultivo primario de linfocitos T murinos extraídos de bazo. Se realizó tinción de los linfocitos tratados con sobrenadantes virales con anticuerpos acoplados a fluoróforos anti CD3-APC/Cy7 y anti CD8-FITC para luego seleccionar y analizar solo la población de linfocitos T citotóxicos.

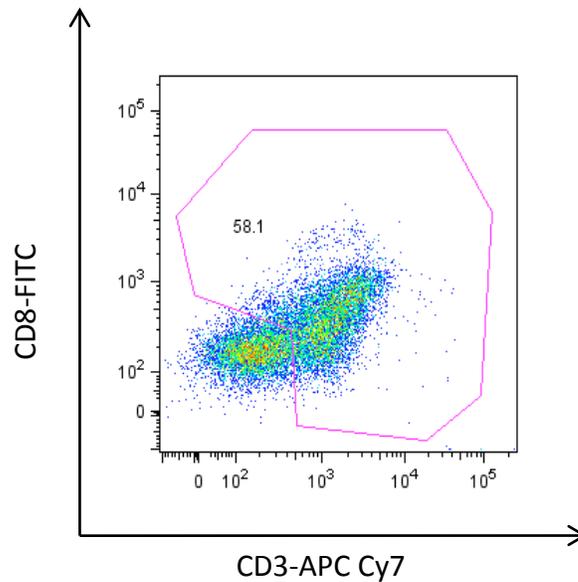


Figura 13. Selección de la población de linfocitos a partir de esplenocitos totales para análisis de transducción. La figura muestra un gráfico de densidad CD8 *versus* CD3, donde se ha seleccionado en rojo la población CD3+ (58,1%) correspondiente a los linfocitos T. Este criterio de selección ha sido utilizado en los ensayos para evaluar el nivel de transducción en linfocitos T excluyendo el resto de las poblaciones celulares presentes en el bazo.

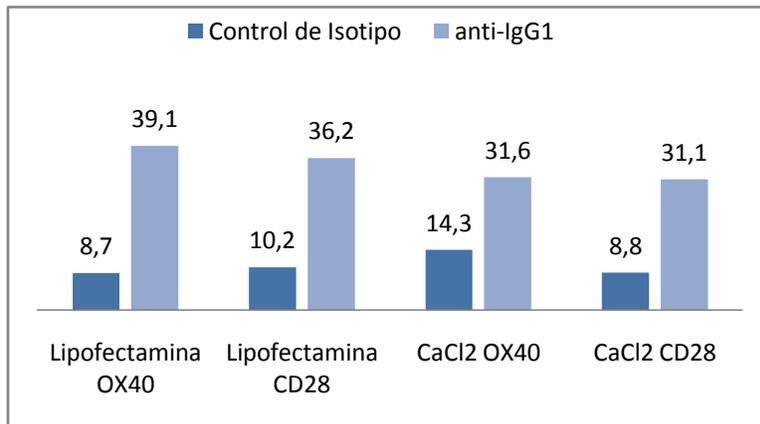


Figura 14. Comparación de la eficiencia de sobrenadantes obtenidos mediante transfección con cloruro de calcio y lipofectamina de las construcciones CAR-OX40 y CAR-CD28 sobre la transducción de linfocitos T utilizando los valores de la intensidad de fluorescencia (“*Mean fluorescence intensity*”, MFI) como indicador de las variaciones de la expresión en la población.

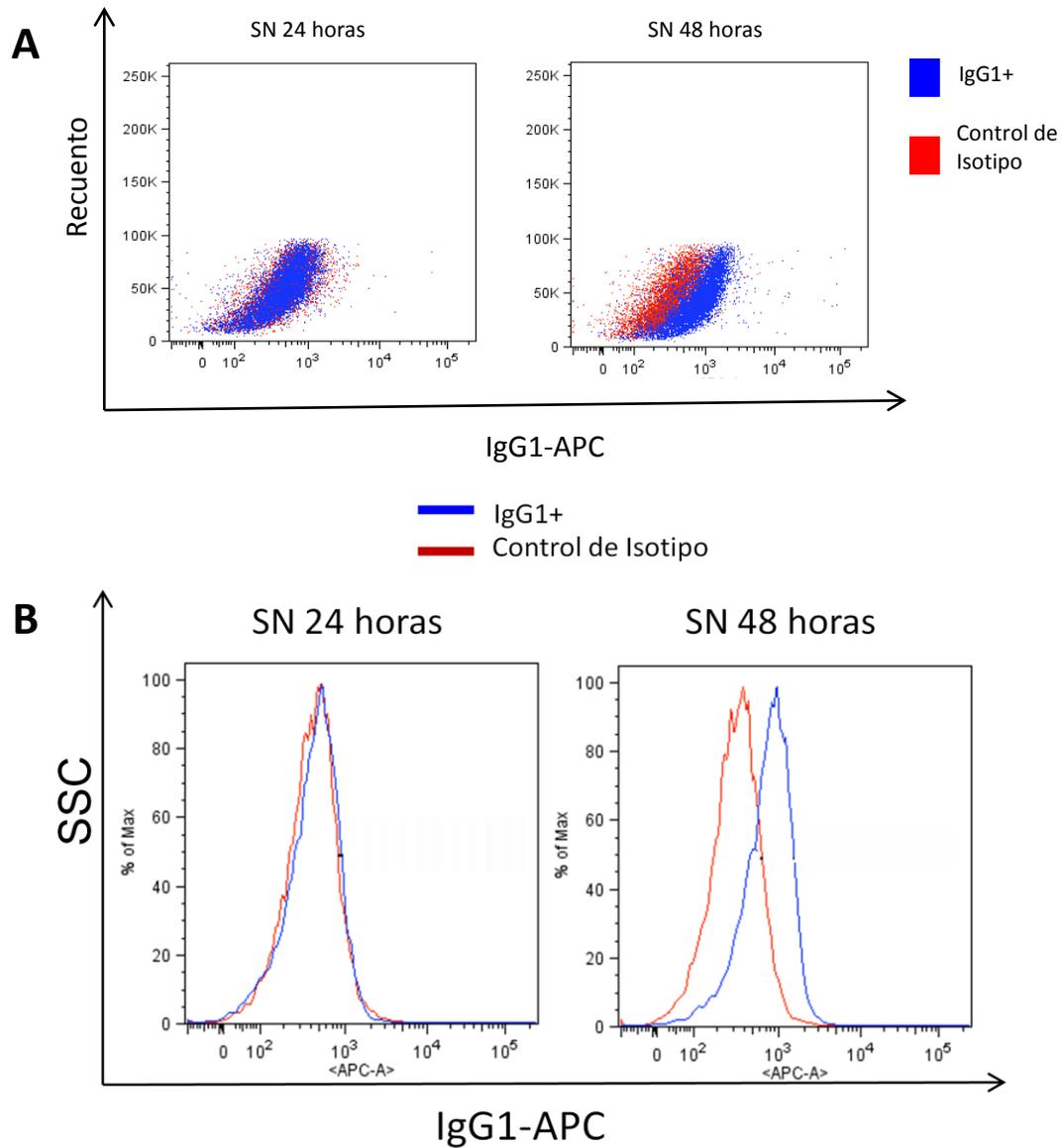


Figura 15. Efecto de los sobrenadantes virales obtenidos a 24h y 48h, sobre la eficiencia de transducción de linfocitos T. Se muestra el gráfico de puntos En el gráfico de la izquierda se observa superposición de las poblaciones, (la fluorescencia observada en la población teñida con anti IgG1 corresponde a la fluorescencia intrínseca celular). En el gráfico de la derecha se observa desplazamiento de la población (expresión efectiva del CAR).

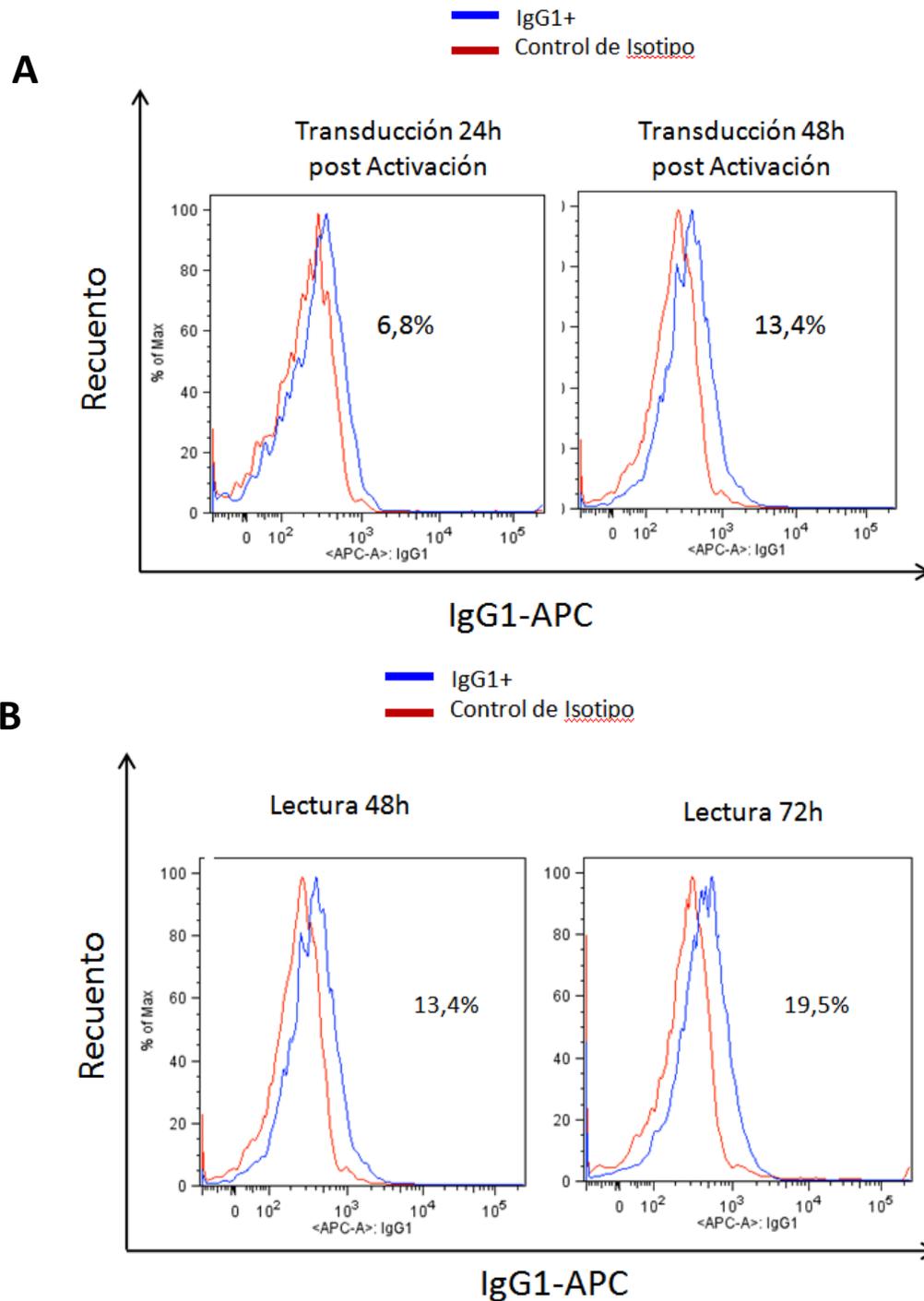


Figura 16. Comparación de la eficiencia de transducción sobre linfocitos T activados durante 24h o 48h. Se compara también la expresión del CAR a través del tiempo, observándose un aumento de la expresión a las 72h al transducir linfocitos activados durante 48h. No se observó transducción sobre linfocitos activados durante 6h (datos no graficados).

7 DISCUSIÓN

El desarrollo de técnicas de transferencia génica *ex vivo* en células linfocitarias humanas, y su manipulación por ingeniería genética para su uso en inmunoterapias autólogas y alogénicas, ha iniciado un nuevo y desafiante capítulo de la terapia génica. El uso de linfocitos modificados capaces de re-direccionar su especificidad contra antígenos tumorales representa una alternativa prometedora para el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico o refractarios a los tratamientos convencionales (Johnson *et al.*, 2009). Sin embargo los resultados obtenidos hasta la fecha en ensayos clínicos han sido insatisfactorios (Bendle *et al.*, 2009; Sadelain, 2009; Schmitt *et al.*, 2009). Los estudios pre clínicos, base de los avances en investigación biomédica, deben avocarse a desarrollar modelos que emulen el sistema humano para así permitir la evaluación precisa de parámetros biológicos y mejora de los protocolos para ser llevados a la clínica una vez optimizados. Por esta razón, en el presente estudio se utilizaron ratones como modelo biológico.

Si bien existen diversos métodos para lograr la integración de material genético exógeno en células de mamíferos, donde los lentivirus destacan por su potencial en la transducción de células humanas (Steffens *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008), el uso de gammaretrovirus es altamente usado en ensayos pre clínicos por su eficiencia en la transducción de líneas murinas (Kerker *et al.*, 2011). Sin embargo, estos últimos precisan de un cultivo celular altamente estimulado para inducir su proliferación y una correcta infección, lo que puede interferir cuando el objetivo es la transducción de células sin diferenciación terminal.

Otro factor crucial para la efectividad de la transducción, es el uso de sobrenadantes virales óptimos. Para esto se evaluaron distintos parámetros, entre ellos, el nivel de confluencia de las células transfectadas es un factor crítico a considerar. Una confluencia superior al 70% aumenta la probabilidad de inhibición por contacto y posterior apoptosis de las células en cultivo, además de disminuir el pH del sobrenadante y un acelerado consumo de los nutrientes en solución, lo que repercutirá posteriormente en la viabilidad de los linfocitos en cultivos. Se debe considerar en el diseño experimental los días de incubación de la línea empaquetadora previos a

la lectura de resultados. Dependiendo de la construcción a transfectar, la eficiencia puede variar, así como la expresión del gen de interés. La expresión de receptores de antígeno quiméricos en la membrana de las células empaquetadoras es un evento relativamente tardío, por lo que la lectura de resultados fue realizada a las 48 horas posteriores a la transfección para asegurar la expresión del transgén en todas las células que efectivamente hayan adquirido los tres plásmidos. Al utilizarse un método de transferencia transitorio, las células infectadas no integrarán el transgén a su genoma, el cual se diluye con cada ciclo de replicación, disminuyendo el porcentaje de expresión al momento de la lectura. Es por esto que la evaluación de la transfección solo debe considerarse como una referencia de la calidad del sobrenadante viral.

Según los datos obtenidos por citometría de flujo, el sobrenadante viral más eficiente es el recuperado a las 48 horas posteriores a la transfección de la línea empaquetadora. Posiblemente, a las 24 horas las células aún están incorporando y transcribiendo la información genética a su sistema. A las 48 horas posteriores a la transfección, las células ya han transcrito y traducido la información y las partículas virales han podido estructurarse en su totalidad. Si el sobrenadante es recolectado posteriormente, éste se torna tóxico por el incremento en el número de células que consumen los nutrientes disponibles y liberan desechos metabólicos al medio. Además, los datos obtenidos indican que el método más eficiente de transfección es por cloruro de calcio. Este aspecto debe ser analizado caso a caso dependiendo de las características de la línea celular a transfectar, sin embargo, el método de cloruro de calcio posee varias ventajas, entre ellas, la flexibilidad del tiempo de incubación con el compuesto activo, ya que la sobreexposición del cultivo celular a lipofectamina se ve reflejado en una alta tasa de mortalidad. Por otra parte, si pensamos en masificar la técnica, el cloruro de calcio se posiciona como un compuesto de fácil adquisición y bajo costo.

Con respecto a la Transducción de los linfocitos T murinos, y como se expuso anteriormente, en sistemas murinos, el vector de elección para transducción de linfocitos es el gammaretroviral, por su alta eficiencia en comparación con vectores lentivirales que muestran baja expresión de CARs en la superficie celular de los linfocitos y por lo tanto la eficiencia de éstos para inmunoterapia se ve disminuida (Baumann *et al.*, 2004; Tsurutani *et al.*, 2007).

Durante el proceso de optimización, se determinó que la estimulación de linfocitos T extraídos desde bazo, con anti-CD3 ξ y anti-CD28, fitohemaglutinina en presencia de interleuquinas (IL-2 e IL-15) pierde su eficiencia luego de 48 horas. Esto puede explicarse por la dilución del estímulo de activación posterior a las 48 horas, lo que genera una baja en la tasa de proliferación y por ende, las partículas retrovirales son incapaces de integrar su genoma en células que no estén dividiéndose. Además, un estímulo de activación inferior a 48 horas nos permite infectar células con alta tasa de proliferación, pero que aún no han adquirido un fenotipo efector, pudiendo eventualmente mantenerse como células de la población de memoria, con especificidad redirigida.

El uso de agentes que potencian la transducción ha sido ampliamente debatido desde los inicios de la técnica (Fresnay *et al.*, 2002), entre ellos, el polibreno es utilizado para neutralizar la carga de glicoproteínas de membrana de la célula hospedera, carga que impide la aproximación entre virión y célula. Más recientemente se ha masificado el uso de otro compuesto, la retronectina, fragmento de la fibronectina que promueve la colocalización de célula y virión (© Agilent Technologies, 2010). Sin embargo, en la práctica, las células tratadas con retronectina tuvieron el menor porcentaje de células viables, sin favorecer la tasa de transducción efectiva. Los fabricantes de RetroNectin, nombre comercial de la retronectina, sugieren 3 protocolos para transducción de células animales. Es necesario testear la totalidad de las opciones propuestas antes de emitir un juicio definitivo, pero es claro el efecto fisiológico que ejerce este compuesto sobre el cultivo de linfocitos T. Al microscopio, las células tratadas con este compuesto se observan de menor tamaño y al analizarlas cualitativamente con azul de tripano se ven mayoritariamente restos celulares.

Como último punto a considerar, es necesario dar tiempo suficiente a las células para que puedan expresar el transgén de interés. Esto dependerá de cada tipo celular y de la naturaleza del vector y de la construcción plasmidial utilizada para estos efectos. Según resultados obtenidos en este estudio, la lectura de resultados de la transducción no debe realizarse antes de 72 horas posteriores a la última infección viral. Estos resultados se condicen con previos ensayos publicados (James Lee, 2009).

A lo largo de todo el estudio se observó una baja viabilidad celular luego de someter las células a infección con retrovirus. Se planteó inicialmente que las reiteradas centrifugaciones a altas velocidades podrían comprometer la integridad celular, hecho que fue descartado al someter a iguales ciclos de centrifugación linfocitos activados no tratados con sobrenadantes virales, los que mostraron un fenotipo normal y alta tasa de viabilidad. Luego de esto, se hizo necesario descartar que los sobrenadantes fueran los responsables de la mortalidad celular. Se compararon células sometidas al mismo tratamiento, en ausencia o presencia de sobrenadantes virales, observándose claras diferencias en cuanto a sobrevida mediante tinción con azul de tripano, al utilizar sobrenadantes de 24, 48 o 72 horas posteriores a la transfección de las células empaquetadoras. Estos cambios estarían asociados principalmente al pH del medio y a la falta de nutrientes remanentes que este aportaría a los linfocitos T, ya que la tasa más baja de sobrevida se observó en aquellas células tratadas con sobrenadantes de 72 horas. Para compensar esto, se decidió suplementar el medio una vez recuperado del cultivo de células HEK 293T, con HEPES como regulador del pH, aminoácidos no esenciales, glutamina, penicilina/estreptomicina y SBF. Se evaluó también si el uso de agentes como el polibreno o retronectina estaría asociado a la sobrevida de los linfocitos T. Si bien el polibreno es un agente citotóxico y no se han referenciado contraindicaciones en el uso de retronectina, en la práctica se observó niveles de sobrevida superiores con el uso de polibreno.

8 CONCLUSIONES

8.1 Vector de transferencia génica

Entre los diversos métodos para lograr la integración estable de transgenes en células animales, el sistema mejor estudiado y validado para el trabajo con sistemas murinos destinados a ensayos pre clínicos es el gammaretroviral. Sin embargo, la opción debe ser evaluada dependiendo de los requerimientos del estudio, del modelo biológico y objetivos del proyecto.

8.2 Sobrenadante Viral

Basada en los datos obtenidos en la presente tesis, es posible afirmar que sobrenadante viral más eficiente es el recuperado a las 48 horas posteriores a la transfección, lo que permite una integración episomal óptima en la línea empaquetadora.

El método más eficiente de transfección en células HEK 293T es por cloruro de calcio. Es importante destacar que la sobreexposición del cultivo a la lipofectamina induce la muerte de este, mientras que un aumento del tiempo de exposición de las células al cloruro de calcio, aumenta la eficiencia de transfección sin daños nefastos al cultivo.

8.3 Viabilidad Celular

En términos de mejorar la tasa de viabilidad celular posterior a la transducción con retrovirus, se debe tener cuidado con el pH del medio de cultivo y sobrenadante retroviral. Para esto se sugiere la utilización de medios con rojo fenol u otro indicador de pH y adición del tampón HEPES. En lo posible se debe disminuir el tiempo de infección por centrifugación, para lo que se recomienda estandarizarlo hasta el nivel donde se produzca la mayor tasa de infección

en el menor tiempo. Para futuros ensayos, se recomienda el uso de polibreno sobre la retronectina, sin embargo no se descartan modificaciones posibles al protocolo con este último compuesto.

8.4 Mantención del cultivo de linfocitos posterior a la transducción

Dadas las características de este estudio, de los vectores, células blanco y plásmidos empleados, se propone la estandarización de la lectura de resultados siendo el tiempo óptimo 72 horas o más, dependiendo del número de días previos que se ha mantenido el cultivo primario de linfocitos T transducidos con receptores de antígeno quiméricos, tiempo que asegura la expresión del transgén. La eficiencia de la transducción se ve aumentada al realizar dos ciclos de infección viral en días consecutivos. El recambio de medio debe ser lo más espaciado posible, para evitar privar a los linfocitos de las citoquinas que secretan en cultivo, cruciales para su mantención.

8.5 Propuesta de trabajo futuro

El trabajo desarrollado en la presente tesis plantea las bases de la optimización del protocolo de transducción de linfocitos T murinos considerando ciertos aspectos fundamentales de la técnica. Sin embargo, es preciso continuar el estudio hasta lograr la estandarización de todas las variables para lograr un protocolo clínico de uso universal a gran escala. Como trabajo a seguir, es necesario abordar el uso de agentes que potencien la transducción (polibreno, retronectina u otros agentes anti-glucocorticoides), establecer si son o no efectivas, y las concentraciones óptimas que no causen mayores daños al cultivo celular.

Una vez que las variables asociadas netamente a la transducción se han estandarizado, se debe analizar la funcionalidad de los linfocitos que expresen efectivamente el receptor de antígeno quimérico. Para esto, se propone llevar a cabo estudios de activación incubando linfocitos

transducidos con su antígeno objetivo purificado acoplado a placas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o cocultivando los linfocitos transducidos con líneas celulares que expresen el antígeno CEA como las líneas celulares LoVo LS174T de adenocarcinoma de colon, y luego evaluar la proliferación mediante ensayo de diacetato de carboxifluoresceínasuccinimidil éster (CFSE) y producción de enzimas citolíticas como perforina y granzima-b.

Una vez establecida la funcionalidad, es necesario estudiar su comportamiento *in vivo* en modelo murino, inoculando células transducidas purificadas en un modelo de cáncer de colon en ratones C57BL/6 para así evaluar la supervivencia de la población, así como regresión de tumores y el efecto profiláctico que puedan tener estos linfocitos sobre individuos inoculados con células tumorales sin tumor establecido.

Realizar los pasos básicos de estandarización para este tipo de técnicas en sistemas murinos tiene la ventaja de permitir el manejo de variables conductuales incontrolables en sistemas humanos, lo que facilita el análisis de datos y la toma de decisiones. Una vez logrados estos objetivos y como última etapa, es posible continuar los estudios en pacientes sanos y pacientes con cáncer en ensayos clínicos.

9 RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer colorrectal y gástrico constituyen el tercer y cuarto tipo de cáncer más común a nivel mundial representando el 17,7% de todas las muertes por tumores. A nivel nacional, los cánceres del aparato digestivo en conjunto son la principal causa de muerte por tumores, constituyendo así un problema importante de salud pública y economía nacional. La respuesta inmune mediada por linfocitos T puede evitar el inicio y progresión del cáncer al eliminar específicamente las células que expresan antígenos tumorales. La inmunoterapia basada en administración de linfocitos T antitumorales ha demostrado su potencial para eliminar tumores y prevenir su recurrencia, sin los efectos secundarios de las terapias convencionales. Sin embargo, la baja eficiencia de las técnicas actuales de transferencia génica para terapia adoptiva y la baja tasa de expresión del transgén en la población celular blanco, constituye la principal barrera que explicaría la baja tasa de casos exitosos en ensayos clínicos. El presente estudio pretende optimizar las condiciones de transducción con vectores retrovirales, de linfocitos T para la producción de líneas celulares estables capaces de expresar receptores de antígeno quiméricos (CARs) específicos contra antígeno carcinoembrionario (CEA) detectado en un amplio rango de los pacientes con cánceres digestivos. El uso de linfocitos purificados activados durante 48 horas, sobrenadantes virales de 48 horas de incubación posteriores a la transfección con cloruro de calcio y la mantención en cultivo durante 72 horas constituye el protocolo óptimo de transducción de linfocitos T. La implementación de una plataforma tecnológica de transducción de linfocitos T con CARs permitirá generar inmunoterapias contra diversos tipos de cánceres, e incluso contra autoinmunidades y rechazo a trasplantes.

10 SUMMARY

According to the World Health Organization, gastric and colorectal cancer is the third and fourth most common cancer worldwide respectively, accounting for 17.7% of all deaths from tumors. Nationally, the digestive tract cancers together are the leading cause of cancer death, thus constituting a major national public health and economy problem. The immune response mediated by T cells can prevent the onset and progression of cancer by eliminating cells expressing specific tumor antigens. Immunotherapy based on administration of T cells redirected to tumors has demonstrated its potential to eliminate them and prevent their recurrence, without the side effects of conventional therapies. However, the low efficiency of current techniques of gene transfer for adoptive therapy and the low rate of transgene expression in the target cell population is the main barrier that would explain the low rate of successful cases in clinical trials. This study aims to optimize conditions for transduction of T cells with gammaretroviral vectors, to produce stable cell lines capable of expressing chimeric antigen receptors (CARs) specific to carcinoembryonic antigen (CEA), which is detected in a wide range of patients with digestive cancers. The use of purified cells activated for 48 hours, viral supernatants recovered after 48 hours of incubation post-transfection with calcium chloride and maintenance in culture of the transduced cells for 72 hours represents the optimal protocol for gene transfer into T cells. The implementation of a technological platform for transduction of T cells with CARs will allow generating immunotherapies against various cancers, and even against autoimmunity or transplant rejection.

11 LITERATURA CITADA

© Agilent Technologies, I. (2010). pVPack-Vector.

Amedei, A., et al. 2011. "T cells and adoptive immunotherapy: recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology." *Clin Dev Immunol* 2011: 320571.

Anson, D. S. 2004. "The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery." *Genet Vaccines Ther* 2(1): 9.

Bannura, G., et al. 2004. "[Carcinoembryonic antigen (CEA) as an independent prognostic factor in colorectal carcinoma]." *Rev Med Chil* 132(6): 691-700.

Baumann, J. G., et al. 2004. "Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection." *J Virol* 78(22): 12537-47.

Bendle, G. M., et al. 2009. "Preclinical development of T cell receptor gene therapy." *Curr Opin Immunol* 21(2): 209-14.

Biasco, L., et al. 2011. "Retroviral Integrations in Gene Therapy Trials." *Mol Ther.*

Cancer, I. A. f. R. o. (2012, 2008). "The Globocan Project." from <http://http://globocan.iarc.fr/>.

Cartellieri, M., et al. 2010. "Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer." *J Biomed Biotechnol* 2010: 956304.

Cheever, M. A., et al. 2009. "The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research." *Clin Cancer Res* 15(17): 5323-37.

Davis, H. E., et al. 2004. "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." *Biophys J* 86(2): 1234-42.

Dudley, M. E., et al. 2001. "Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma." *J Immunother* 24(4): 363-73.

Dudley, M. E., et al. 2002. "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* 298(5594): 850-4.

Edge, S. B. y C. C. Compton. 2010. "The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM." *Ann Surg Oncol* 17(6): 1471-4.

- Farkas, A. M. y O. J. Finn.** 2010. "Vaccines based on abnormal self-antigens as tumor-associated antigens: immune regulation." *Semin Immunol* 22(3): 125-31.
- Franke, E. K., et al.** 1994. "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." *Nature* 372(6504): 359-62.
- Fresnay, S., et al.** 2002. "Polybrene and interleukin-4: two opposing factors for retroviral transduction of bone-marrow-derived dendritic cells." *J Gene Med* 4(6): 601-12.
- Fujita, Y., et al.** 2008. "Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases." *Bone Marrow Transplant* 41(2): 193-8.
- Haller, D. G.** 2007. "Current approaches and management of advanced colorectal cancer." *Adv Stud Med.* 7(2): 39-44.
- Hammarstrom, S.** 1999. "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." *Semin Cancer Biol* 9(2): 67-81.
- Hart, D. P., et al.** 2008. "Retroviral transfer of a dominant TCR prevents surface expression of a large proportion of the endogenous TCR repertoire in human T cells." *Gene Ther* 15(8): 625-31.
- Health, N. I. o. (2012, 13 Jun 2006). "Biological therapies for cancer." from <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/biological>.
- Hu, W. S. y V. K. Pathak.** 2000. "Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy." *Pharmacol Rev* 52(4): 493-511.
- James Lee, M. S., Renier Bretjens (2009). Methods in Molecular Biology.
- Jena, B., et al.** 2010. "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* 116(7): 1035-44.
- Johnson, L. A., et al.** 2009. "Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen." *Blood* 114(3): 535-46.
- Kalos, M., et al.** 2011. "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia." *Sci Transl Med* 3(95): 95ra73.
- Kerkar, S. P., et al.** 2011. "Genetic engineering of murine CD8+ and CD4+ T cells for preclinical adoptive immunotherapy studies." *J Immunother* 34(4): 343-52.

- Kochenderfer, J. N., et al.** 2010. "Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19." *Blood* 116(20): 4099-102.
- Lee, H. J., et al.** 2009. "Retronectin enhances lentivirus-mediated gene delivery into hematopoietic progenitor cells." *Biologicals* 37(4): 203-9.
- Lopez, J., Hornig, AE., Molt, FC., Mariánel, PP., Avandaño, RH.** 2005. "Antígeno carcinoembrionario preoperatorio y riesgo de metástasis en el cáncer colorectal. ." *Cuadernos de Cirugía* 19: 22-26.
- Mahmoud, S. M., et al.** 2011. "Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer." *J Clin Oncol* 29(15): 1949-55.
- Merhavi-Shoham, E., et al.** 2011. "Genetically modulating T-cell function to target cancer." *Semin Cancer Biol.*
- Morgan, R. A., et al.** 2006. "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." *Science* 314(5796): 126-9.
- Nagorsen, D. y E. Thiel.** 2006. "Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 12(10): 3064-9.
- Park, J. R., et al.** 2007. "Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma." *Mol Ther* 15(4): 825-33.
- Park, T. S., et al.** 2011. "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.
- Prieto, J., et al.** 2004. "Biologic therapy of liver tumors." *Surg Clin North Am* 84(2): 673-96.
- Pule, M. A., et al.** 2008. "Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma." *Nat Med* 14(11): 1264-70.
- Qiu, M. Z., et al.** 2010. "Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in blood using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to predict recurrence of gastric adenocarcinoma." *J Transl Med* 8: 107.
- Rao, B., et al.** 2011. "Clinical outcomes of active specific immunotherapy in advanced colorectal cancer and suspected minimal residual colorectal cancer: a meta-analysis and system review." *J Transl Med* 9: 17.
- Roa, I., et al.** 1992. "[Gallbladder cancer: immunohistochemical expression of CA-19-9, epithelial membrane antigen, dupan-2 and carcinoembryonic antigen]." *Rev Med Chil* 120(11): 1218-26.

- Rosenberg, N. y P. Jolicoeur.** 1997. "Retroviral Pathogenesis."
- Sadelain, M.** 2009. "T-cell engineering for cancer immunotherapy." *Cancer J* 15(6): 451-5.
- Schmitt, T. M., et al.** 2009. "T cell receptor gene therapy for cancer." *Hum Gene Ther* 20(11): 1240-8.
- Seliger, B.** 2005. "Strategies of tumor immune evasion." *BioDrugs* 19(6): 347-54.
- Sommermeier, D., et al.** 2006. "Designer T cells by T cell receptor replacement." *Eur J Immunol* 36(11): 3052-9.
- Steffens, C. M., et al.** 2002. "Interleukin-7-treated naive T cells can be productively infected by T-cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1." *Blood* 99(9): 3310-8.
- Strohlein, M. A., et al.** 2011. "Immunotherapy of peritoneal carcinomatosis with the antibody catumaxomab in colon, gastric, or pancreatic cancer: an open-label, multicenter, phase I/II trial." *Onkologie* 34(3): 101-8.
- Takeda, T., et al.** 2010. "[Multidisciplinary therapy for 984 cancer patients--hyperthermic immunotherapy]." *Gan To Kagaku Ryoho* 37(12): 2243-5.
- Till, B. G., et al.** 2008. "Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells." *Blood* 112(6): 2261-71.
- Tsouma, A., et al.** 2010. "Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients." *World J Gastroenterol* 16(47): 5965-74.
- Tsurutani, N., et al.** 2007. "Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells." *J Virol* 81(2): 677-88.
- von Schwedler, U. K., et al.** 2003. "The protein network of HIV budding." *Cell* 114(6): 701-13.
- Yang, S., et al.** 2008. "Clinical-scale lentiviral vector transduction of PBL for TCR gene therapy and potential for expression in less-differentiated cells." *J Immunother* 31(9): 830-9.
- Zhang, L. y R. A. Morgan.** 2011. "Genetic engineering with T cell receptors." *Adv Drug Deliv Rev.*

12 ANEXOS

Anexo 1. Protocolo Extracción de Esplenocitos.

- 1) Extraer bazo quirúrgicamente y limpiarlo de restos de grasa. Dejar en PBS 1X.
- 2) Lavar bazo con Alcohol 70%, luego PBS 1X y dejar en 10mL de medio RPMI.
- 3) Perfundir bazo sobre medio RPMI con jeringa de tuberculina.
- 4) Recuperar PBS con esplenocitos y centrifugar a 300g por 5 minutos.
- 5) Resuspender en 3ml de acetato de potasio (AcK), agitar en vortex y llevar a 6ml de AcK.
- 6) Mezclar por inversión 60 veces.
- 7) Centrifugar a 300x g por 5 minutos y resuspender en 6mL de PBS 1X para lavar.
- 8) Centrifugar a 300x g por 5 minutos y resuspender en 6mL de RPMI.
- 9) Agitar en vortex y contar células.
- 10) Llevar a una concentración de 2×10^6 a 3×10^6 células por mL en medio RPMI y suplementar con IL-2 (100U/mL), IL-15 (10ng/mL), PHA (3ug/mL), α CD3 y α CD28 (100ng/mL) para activación.

Anexo 2. Protocolo Transfección de células HEK293 con cloruro de calcio.

- 1) Utilizar placas 6 pocillos con 70% de confluencia.
- 2) 2 horas antes de transfectar, cambiar medio completo a las células.
- 3) Pasadas 2 horas, transfectar con (por placa):
 1. 1,5ug de plásmido gag-pol
 2. 1,5ug de plásmido con DNA de interés
 3. 1,5ug de plásmido env
- 4) Aforar el volumen de la mezcla de plásmidos con agua destilada estéril a 20ul.
- 5) Preparar tubos eppendorf con 520ul de buffer HBS 2X por placa.

- 6) Preparar tubo con 500ul por placa de CaCl₂ 0,25M y mezclar (pipeteando para no formar precipitado) con la cantidad de mezcla de DNA necesario para el número de placas.
- 7) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Agregar los 520ul de DNA/CaCl₂ a los 520ul de buffer HBS 2X, gota a gota con el tubo de buffer sobre vortex, para que no precipite.
- 9) Inmediatamente después agregar gota a gota la mezcla sobre las placas cubriendo toda la superficie. Homogeneizar.
- 10) Incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 16h.
- 11) Cambiar medio de cultivo por medio completo fresco. Incubar a 37°C con 5% de CO₂.
- 12) Recolectar sobrenadante viral 48 horas después. Usar inmediatamente o almacenar a -80° C.

Anexo 3. Protocolo de Transfección de células HEK293 con Lipofectamina.

- 1) Utilizar placas de 6 pocillos con 70 a 80% de confluencia.
- 2) Cambiar medio cultivo a células al menos media hora antes de transfectar con 1ml de medio OPTIMEM no suplementado por pocillo.
- 3) Para la transfección utilizar:
 1. 1,5ug de plásmido gag-pol
 2. 1,5ug de plásmido con DNA de interés
 3. 1,5ug de plásmido env
- 4) Preparar mezcla de 3ul de lipofectamina por cada µg de DNA en 250ul de OPTIMEM no suplementado. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 5) Preparar mezcla con 1,5ug de cada plásmido en 250ul de OPTIMEM no suplementado.
- 6) Agregar mezcla de DNA a tubo con Lipofectamina. Mezclar con pipeta arriba y abajo suavemente e incubar 15 minutos.
- 7) Cambiar nuevamente el medio de las células con 1ml OPTIMEM no suplementado
- 8) Agregar los 500ul de mezcla a cada pocillo. Homogeneizar.

- 9) Incubar 4h a 37°C con 5% de CO₂.
- 10) Cambiar medio de cultivo por medio fresco DMEM suplementado.

Anexo 4. Protocolo de Transducción de Linfocitos (placa 12 o 24 pocillos).

- 1) Precalentar sobrenadantes virales (ya filtrados) a 37° C.
- 2) Suplementar los sobrenadantes con NEA, piruvato, IL-2 (25U/ml) y polibreno (8ug/ml).
- 3) Recuperar linfocitos y centrifugar a 400g por 4 minutos para remover medio de cultivo. Alternativamente, centrifugar las placas a 400g por 4 minutos y aspirar suavemente el medio de los pocillos.
- 4) Resuspender los linfocitos en sobrenadantes suplementados y sellar la placa con parafilm.
- 5) Centrifugar por 90 minutos a 1000g a 32° C.
- 6) Quitar parafilm e incubar toda la noche a 37° C.
- 7) Repetir paso 5) luego de 24h.
- 8) Al día siguiente cambiar el medio por RPMI suplementado con IL-2 (25U/ml).
- 9) Mantener en cultivo 2 a 5 días más.
- 10) Analizar nivel de transducción mediante citometría de flujo.