



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

GENERACIÓN DE UN CAR-T ANTI CD44V6 PARA LA ELIMINACIÓN *IN VITRO*

DE CÉLULAS DE CÁNCER GÁSTRICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BECERRIL RICO JARED

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, OCTUBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

GENERACIÓN DE UN CAR-T ANTI CD44V6 PARA LA ELIMINACIÓN *IN VITRO*

DE CÉLULAS DE CÁNCER GÁSTRICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BECERRIL RICO JARED

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, OCTUBRE 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0615/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **19 de junio de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **BEERRIL RICO JARED** con número de cuenta **311280856** con la tesis titulada **“GENERACIÓN DE UN CAR-T ANTI CD44V6 PARA LA ELIMINACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS DE CÁNCER GÁSTRICO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Vocal: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
Vocal: DRA. MARÍA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Secretario: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de agosto de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht

Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM por abrirme las puertas y permitirme seguir mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado para mis estudios (CVU 1146686).

A mi tutora la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez por brindarme siempre su guía y enseñanza en todo mi proceso de formación, por confiar en mi capacidad para realizar este proyecto, y sobre todo por su amistad y consejos.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá y la Dra. Marcela Lizano Soberón, por su apoyo, asesoría, y tiempo brindado en todo mi proceso de formación y en el desarrollo de este proyecto.

Agradecimientos a título personal

A mi madre por siempre apoyarme en momentos difíciles y estar incondicionalmente.

A mi padre por todas sus enseñanzas y siempre impulsarme a alcanzar lo impensable.

A mi esposa por cariño y paciencia.

Índice de Contenido

ÍNDICE DE ABREVIATURS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. Antecedentes.....	5
1.1 Cáncer Gástrico.....	5
1.1.1 Epidemiología	5
1.1.2 Diagnóstico y Clasificación	5
1.1.3 Tratamiento y Pronóstico.....	6
1.2 Células Troncales Cancerosas.....	7
1.2.1 Definición.....	7
1.2.2 Identificación de CTCs	8
1.2.3 Resistencia a tratamientos.....	9
1.3 CD44.....	10
1.3.1 Estructura y Gen de CD44.....	10
1.3.2 Regulación de CD44.....	11
1.3.3 Interacciones intra y extracelulares de CD44	12
1.4 CD44v6.....	13
1.4.1 CD44v6 y CTCs.....	14
1.4.2 CD44v6 y cáncer gástrico.....	14
1.5 Terapias contra CTCs	15
1.6 CAR-Ts	15
1.6.1 Activación de Linfocitos T.....	16
1.6.2 Estructura y Activación del CAR.....	18
1.6.3 Síntesis de CAR-Ts.....	19
1.6.4 Efectividad de CAR-Ts como terapia anti-neoplásica.....	20
1.6.5 Limitaciones de la terapia CAR-T	21
1.6.6 CAR-Ts como terapia contra CTCs.....	23
2. Planteamiento del Problema	25
3. Objetivos.....	26
4. Hipótesis	27
5. Metodología	28

6. Resultados	32
Análisis bioinformático de CD44v6	32
Clonación y Aislamiento del Plásmido Lentiviral	35
Producción y Titulación Lentiviral	36
Eficiencia de Transducción en Linfocitos T humanos	38
Evaluación del efecto citotóxico de los CAR-Ts sobre cultivos celulares de cáncer gástrico	39
Evaluación de la citotoxicidad de los CAR-Ts sobre cultivos de células HaCaT	41
7. Discusión	43
8. Conclusiones	46
9. Referencias Bibliográficas	46

Índice de Abreviaturas

ALDH – Aldehído Deshidrogenasa

CAR – *Chimeric Antigen Receptor*

CAR-Ts – *Chimeric Antigen Receptor T cells*

CG – Cáncer Gástrico

CPA – Células Presentadoras de Antígenos

CTC – Células Troncales Cancerosas

CTCGs – Células Troncales Cancerosas Gástricas

ERM – *Ezrin-Radixin-Moesin*

ESRP1 - *Epithelial Splicing Regulatory Protein 1*

E:T – *Effector : Targeted cell*

FACs – Fibroblastos Asociados a Cáncer

FDA – *Food and Drug Administration*

HGF - *Hepatocyte Growth Factor*

HIF-1 α - *Hypoxia Inducible Factor-1 α*

IFM – *Intensidad de Fluorescencia Media*

MATs – *Macrófagos Asociados a Tumor*

MCP-1 - *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MDR - *Multidrug Resistance Gene*

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

miRNA - *micro Ribonucleic Acid*

MMP-9 - *Matrix Metalloproteinase-9*

MOI – *Multiplicity of Infection*

ORR – *Overall Response Rate*

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

TCR – *T Cell Receptor*

TEM – *Transición Epitelio Mesenquimal*

TME – *Transición Mesenquimal Epitelial*

UT – *Unidades de Transducción*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es uno de los principales tipos de cáncer en el mundo y a nivel nacional, destacando por su alta incidencia, mortalidad y recurrencia. Estas últimas dos características dejan ver que las terapias actuales contra esta neoplasia son insuficientes y poco efectivas. La carencia de respuesta que muestra el CG a tratamientos actuales se ha intentado explicar mediante diversas teorías, entre las que destaca el modelo jerárquico de células troncales, el cual contempla la existencia de una subpoblación tumoral denominada como CTCs (Células Troncales Cancerosas) que se caracteriza por su capacidad de autorrenovación, la capacidad de formar nuevos tumores mediante proliferación y diferenciación celular, además de otras características de relevancia clínica como una alta resistencia a quimioterapia y radioterapia. Dadas las destacadas características de las CTCs, y ante la poca efectividad en su eliminación por parte de los tratamientos actuales, se han propuesto diversas estrategias para su identificación y eliminación.

Dentro del CG, la proteína de superficie CD44 se ha propuesto como uno de los marcadores con mayor especificidad para la identificación de CTCGs (Células Troncales Cancerosas Gástricas), sin embargo, su expresión se puede detectar en la mayoría de tejidos sanos. A pesar de esto, existen variantes de CD44 generadas por *splicing* alternativo que muestran asociación con CTCs, como lo es CD44v6.

Entre las terapias de reciente desarrollo contra el cáncer se encuentra la inmunoterapia basada en CAR-Ts (del inglés *Chimeric Antigen Receptor T cells*), linfocitos T modificados genéticamente para la expresión de un receptor similar a un anticuerpo monoclonal que, al dirigirse contra una proteína específica presente en células tumorales, permite la actividad anti-tumoral de los linfocitos T sin necesidad de la presentación de antígenos y activación celular mediada por células presentadoras de antígenos. Es entonces que la presente investigación propone la generación de CAR-Ts dirigidos contra CD44v6 para la eliminación de CTCGs de manera *in vitro*.

Nuestros resultados muestran que entre las isoformas que contienen el exón v6 y son capaces de anclarse a la membrana celular, CD44v3-v10 es la más abundante en el CG por lo que podría ser la principal isoforma identificable por la terapia propuesta. Esta isoforma se expresa preferentemente en tejido gástrico tumoral comparado con el sano, relacionándose su expresión con proteínas clave en la función y señalización asociada a CTCs. Además, confirmamos que la expresión de esta

isoforma portadora del exón v6 se expresa ligera o nulamente en la mayoría de tejidos sanos; lo que sugiere una adecuada especificidad de CD44v6 como blanco en la terapia contra CTCGs.

Usando la metodología aquí descrita se generaron CAR-Ts funcionales anti-CD44v6, que muestran una media-alta actividad citotóxica frente a células de CG en una forma concentración-dependiente. Por otra parte, al evaluar estos CAR-Ts frente a queratinocitos inmortalizados se observó un menor efecto citotóxico. De forma inesperada, aunque en la línea celular de CG utilizada solo el 8.13% de las células son CD44v6+, incluso a bajas dosis los CAR-Ts lograron una citotoxicidad casi 8 veces más de lo esperado, con solo efectos mínimos sobre queratinocitos inmortalizados. Tales hallazgos sugieren que la terapia de CAR-Ts anti-CD44v6 podría tener una adecuada actividad anti-tumoral y pocos efectos adversos en modelos *in vivo* de CG.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is one of the most common types of cancer in the world and Mexico, standing out for its high incidence, mortality and recurrence. These last two characteristics show that current therapies against this neoplasm are insufficient and ineffective. The lack of response of GC to current treatments has been explained by various theories, among which the hierarchical model of stem cells stands out, which contemplates the existence of a tumor subpopulation called CSCs (Cancer Stem Cells) that is characterized by its capacity for self-renewal, the ability to form new tumors through cell proliferation and differentiation, as well as other characteristics of clinical relevance such as a high resistance to chemotherapy and radiotherapy. Given the relevant characteristics of CTCs and the ineffectiveness of current treatments, several strategies have been proposed for their identification and elimination.

Within GC, the surface protein CD44 has been proposed as one of the markers with the highest specificity for the identification of GCSCs (Gastric Cancer Stem Cells), however, its expression can be detected in most healthy tissues. Despite this, there are variants of CD44 generated by alternative splicing that show association with CSCs, such as CD44v6.

Immunotherapy based on CAR-Ts (Chimeric Antigen Receptor T cells) is among the recently developed therapies against cancer, described as T lymphocytes genetically modified for the expression of a monoclonal antibody-like receptor that, when directed against a specific antigen present on tumor cells allows the anti-tumor activity of T lymphocytes without the need for antigen presentation and cell activation mediated by antigen-presenting cells. Therefore, the present investigation proposes the generation of CAR-Ts directed against CD44v6 for the GCSCs in vitro elimination.

Our results show that among the isoforms that contain exon v6 and are able to anchor to the cell membrane, CD44v3-v10 is the most abundant in GC so it could be the main isoform identifiable by the proposed therapy. This isoform is preferentially expressed in gastric tumor tissue compared to healthy tissue, and its expression is related to key proteins in the function and signaling associated with CSCs. Furthermore, we confirmed that the expression of this exon v6-bearing isoform is expressed slightly or null in most of the healthy tissues, suggesting an adequate specificity of CD44v6 as a target in therapy against GCSCs.

Using the methodology described here, functional anti-CD44v6 CAR-Ts were generated, which showed a medium-high dose-dependent cytotoxic activity against GC cells. On the other hand, when evaluating these CAR-Ts against immortalized keratinocytes, a low cytotoxic effect was observed. Unexpectedly, although in the GC cell line used only 8.13% of the cells were CD44v6+, even with low doses, the CAR-Ts achieved almost 8-fold more cytotoxicity than expected, with only minimal effects in immortalized keratinocytes. Such findings suggest that CAR-Ts anti-CD44v6 may have adequate anti-tumor activity and few adverse effects in in vivo GC models.

1. Antecedentes

1.1 Cáncer Gástrico

1.1.1 Epidemiología

Actualmente, el cáncer representa una de las enfermedades de mayor relevancia a nivel mundial y nacional, estimándose cerca de 19.29 millones de nuevos casos y 9.96 millones de muertes alrededor del mundo en 2020 de acuerdo con la WHO (World Health Organization) International Agency for Research on Cancer (Sung et al., 2021). Dentro de las principales neoplasias se encuentra el cáncer gástrico (CG), cuyo número de casos anuales lo colocan en el 5º lugar en incidencia y el 4º en mortalidad a nivel mundial, mientras que en México ocupa el 6º lugar de incidencia y 5º en mortalidad (Sung et al., 2021).

Si bien no existe una etiología precisa que explique el CG, existen numerosos factores de riesgo entre los cuales podemos encontrar la infección crónica por *Helicobacter pylori*, infección por el virus de Epstein-Barr, tabaquismo, el género masculino, edad avanzada, obesidad, cirugía gástrica previa, gastritis hipertrófica o metaplasia, pólipos hiperplásicos en estómago, dieta baja en fruta y vegetales, dieta alta en sales y nitrogenados, entre otros (Yusefi et al., 2018).

1.1.2 Diagnóstico y Clasificación

En este sentido, el CG se manifiesta comúnmente por signos y síntomas como anorexia, dispepsia, saciedad temprana, náuseas y vómito persistente, pérdida de peso, dolor abdominal, disfagia, hematemesis, melena, y palidez de tegumentos (Van Cutsem et al., 2016). Estas manifestaciones clínicas son de gran importancia debido a que permiten la sospecha de la enfermedad, sin embargo, el diagnóstico del CG requiere de estudios confirmatorios. Para ello, el estudio de primera elección para el diagnóstico del CG es la panendoscopia con toma de biopsia, el cual cuenta con una sensibilidad del 98% cuando se obtienen 6-7 muestras de biopsia (Takahashi et al., 2013).

Así mismo, el CG se describe como una patología de características variables las cuales han dado paso a múltiples clasificaciones que toman en cuenta las diferentes características de la enfermedad. En este sentido, existen clasificaciones basadas en el sitio anatómico de afección, en las características histológicas como la clasificación de Lauren, en las características macroscópicas como la clasificación de Borrmann, y en características clínicas como la clasificación TNM (Figura 1).

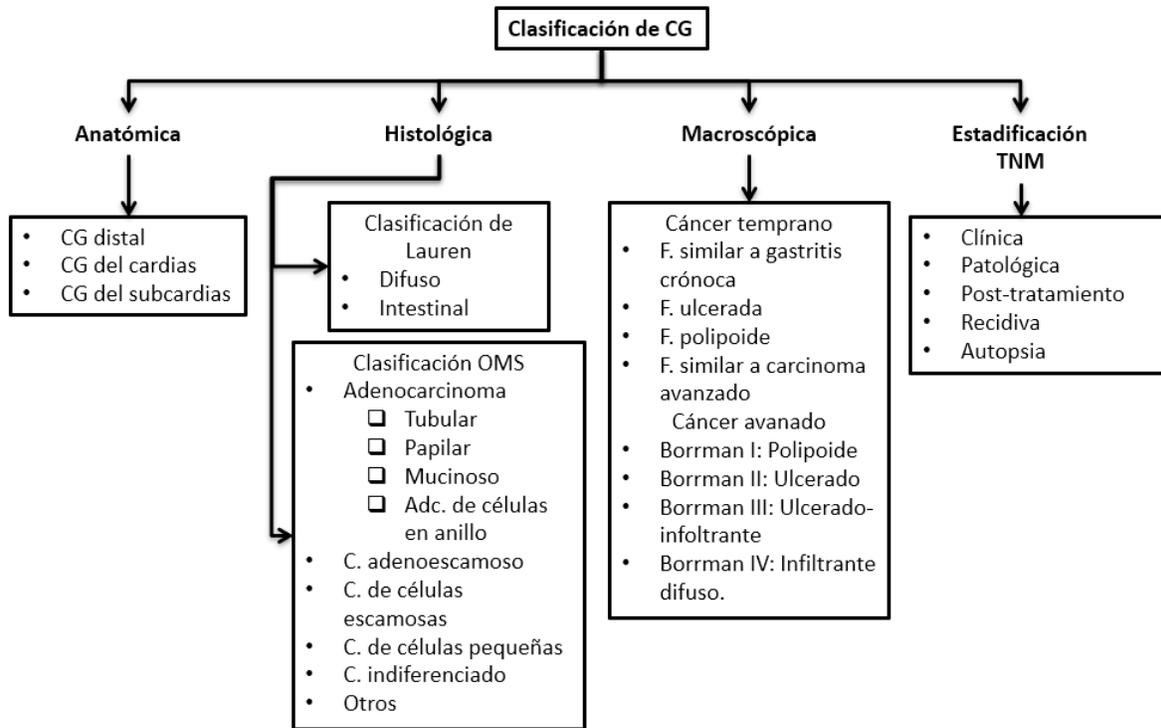


Figura 1. Principales métodos de clasificación para el cáncer gástrico. CG: Cáncer Gástrico, OMS: Organización Mundial de la Salud, C: Carcinoma, F: Forma, Est: Estadificación. *Figura de creación propia.*

1.1.3 Tratamiento y Pronóstico

Las clasificaciones antes mencionadas permiten al médico establecer un plan de manejo y un pronóstico para cada paciente, según sean las características específicas del CG. Entre las principales modalidades de tratamiento para el CG podemos destacar la cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia; es entonces que la elección de cada modalidad terapéutica dependerá del objetivo del tratamiento (Van Cutsem et al., 2016).

El manejo quirúrgico suele ser recomendado especialmente para estadios tumorales tempranos (Tis-T2, N0, M0), o bien posterior a un tratamiento neo-adyuvante en pacientes con estadios II o III (cualquier T, cualquier N, M0) (Van Cutsem et al., 2016). Por su parte, la quimioterapia se reserva para pacientes con estadios tumorales avanzados, pudiendo administrarse previo a la cirugía (neo-adyuvante) o posterior a la misma (adyuvante). El esquema quimioterapéutico de primera línea en CG consta de cisplatino + 5-fluorouracilo (o bien oxaliplatino + capecitabina), pudiendo usarse un esquema triple con epirubicina recomendado especialmente en casos con metástasis (Ilson, 2021).

Dentro de la terapia dirigida e inmunoterapia encontramos los anticuerpos monoclonales anti-Her2 como el trastuzumab, medicamento de primera línea en pacientes Her2 positivos (Machlowska et al., 2020). Además, recientemente se ha recomendado el uso de anticuerpos bloqueadores de PD-1 como pembrolizumab o nivolumab en la primera línea de tratamiento de pacientes Her2 positivos (en asociación con 5-fluorouracilo, cisplatino y trastuzumab) debido a que el tratamiento combinado con pembrolizumab genera una tasa general de respuesta de 74%, mientras que la combinación con placebo genera solo 52% (Ilson, 2021).

A pesar de las diversas terapias disponibles, el CG se caracteriza por ser una neoplasia de mal pronóstico, observándose que en estadios avanzados ninguna opción terapéutica ofrece más de 15 meses de vida (Smyth et al., 2020). Otro gran problema del CG es su alta tasa de recurrencia, donde se reporta que pacientes sometidos a cirugía + quimioterapia obtienen una supervivencia libre de recurrencia de solo 47.4% a 3 años (Mokadem et al., 2019), lo que permite observar que los tratamientos actuales siguen siendo poco efectivos.

1.2 Células Troncales Cancerosas

1.2.1 Definición

Debido a la poca efectividad de las terapias en el CG y otros modelos de cáncer, se ha buscado establecer los diversos factores que determinan esta problemática, surgiendo así teorías como el modelo jerárquico de evolución tumoral. Este modelo establece la existencia de múltiples poblaciones de células neoplásicas con distinta capacidad de proliferación y diferenciación celular, pudiendo verse esta capacidad de una forma jerárquica. Dentro de esta distribución jerárquica de capacidades existe una subpoblación de células neoplásicas, llamadas Células Troncales Cancerosas (CTCs), las cuales mantienen la mayor jerarquía en el modelo debido a que poseen propiedades asociadas a la troncalidad como autorrenovación, un estado celular de indiferenciación, y la capacidad de diferenciarse hacia diversos fenotipos celulares. Sin embargo, también poseen una elevada capacidad de iniciación de tumores, proliferación celular, alta capacidad metastásica a través de la Transición Epitelial Mesenquimal (TEM), resistencia a tratamientos anti-neoplásicos, así como inmunorresistencia (Codd et al., 2018). En este sentido, las CTCs son capaces de dar origen a otros fenotipos celulares para la iniciación, mantenimiento y progresión tumoral. Esto es posible debido a que las CTCs pueden presentar divisiones celulares asimétricas que permiten dar origen a dos tipos celulares distintos: 1) una célula de iguales propiedades a la inicial (autorrenovación), 2)

una célula amplificadora transitoria que al replicarse dará origen a células tumorales más diferenciadas (Figura 2A) (Atashzar et al., 2020; Dalerba et al., 2007).

En cuanto al origen de las CTC, existen diversas teorías que proponen tanto a células troncales adultas transformadas, como a células diferenciadas. Entre las teorías más aceptadas se encuentra la generación de mutaciones y re-arreglos cromosómicos en células troncales adultas o células diferenciadas, cuyo resultado sería la generación de CTCs. Otras teorías proponen a la fusión celular entre una SC y una célula diferenciada transformada como el origen de las CTCs (Bjerkvig et al., 2005). Específicamente las CTCGs (Células Troncales Cancerosas) tienen un origen incierto, sin embargo, se ha reportado que ante lesiones gástricas generadas por *Helicobacter* se genera un reclutamiento de células derivadas de la médula ósea que tras incorporarse en las glándulas gástricas favorecen la progresión de metaplasia a displasia, para posteriormente iniciar el tumor gástrico (Houghton et al., 2004), lo que permite establecer a las células derivadas de la médula ósea como uno de los posibles orígenes de las CTCGs.

1.2.2 Identificación de CTCs

Dadas las importantes características de las CTCs, en el último par de décadas se han generado múltiples intentos para su identificación en los distintos tipos de cáncer. Actualmente, el "gold standar" para confirmar que una subpoblación celular forma parte de las CTCs es a través del xenotransplante seriado en modelos animales, método que permite confirmar su capacidad como iniciadoras de tumor, potencial de proliferación, diferenciación celular, y autorrenovación (Figura 2B) (Brungs et al., 2016).

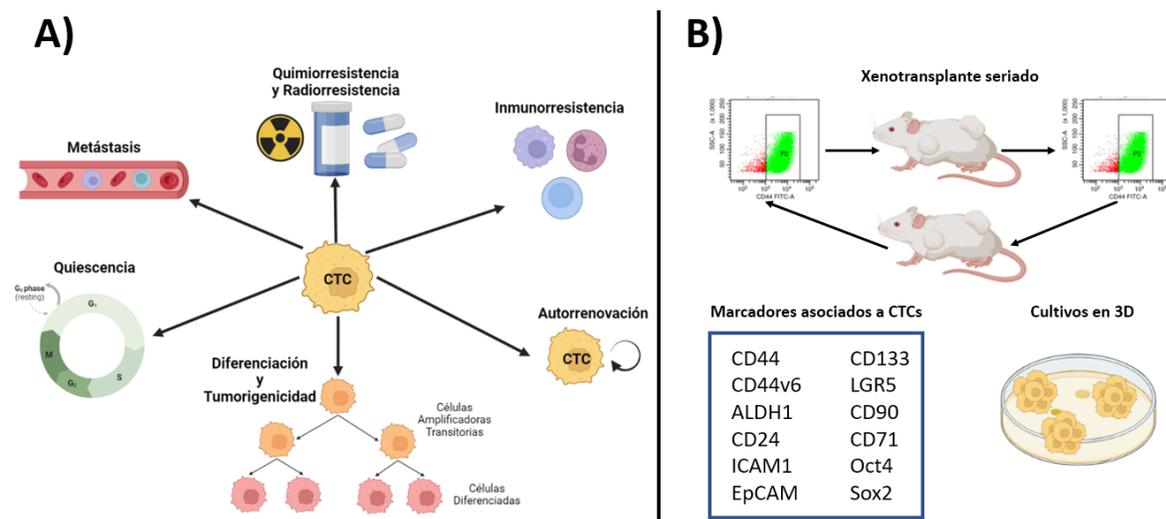


Figura 2. Características y estudio de las CTCs. A) Las CTCs cuentan con características como autorrenovación,

diferenciación y tumorigenicidad, sin embargo, la mayor parte del tiempo se mantienen en quiescencia; cuentan con alto potencial metastásico, siendo resistentes a terapias anti-neoplásica y a la actividad inmunológica. B) Principales metodologías para la identificación y estudio de CTCs, entre los que destacan el xenotransplante seriado, enriquecimiento de CTC mediante cultivos 3D, y la identificación mediante marcadores asociados a CTCs. CTC: Células Troncales Cancerosas. *Figura creada en Biorender.*

Por otra parte, dentro de la literatura es aceptado evaluar las propiedades de troncalidad de una subpoblación a través de ensayos de tumor-esferas en cultivos 3D (Figura 2B). Para ello es posible utilizar técnicas como: 1) cultivo en suspensión libre de suero, 2) cultivo mediante andamios, 3) cultivos de inclusión en gel, 4) biorreactores rotacionales, entre otros (D. Lv et al., 2017). Tras este tipo de ensayos suele evaluarse la capacidad de autorrenovación y diferenciación celular mediante subcultivos seriados de tumor-esferas, la capacidad de invasión mediante ensayos trans-well, evaluación de factores de transcripción asociados con pluripotencia como Sox2, Nanog y Oct4, además de otras evaluaciones como ensayos de formación de colonias, de proliferación, así como de sensibilidad a quimioterapéuticos (Calvet et al., 2014; Franco et al., 2016; Han et al., 2014).

Dado lo complejo que resulta confirmar si una subpoblación celular corresponde a CTCs, se han buscado establecer marcadores asociados a CTCs que permitan identificar subpoblaciones previamente validadas con características troncales (Figura 2B). Para la específica identificación de CTCGs es posible destacar los marcadores de superficie EpCAM, CD133, LGR5, CD49f, ICAM-1, CD90, CD71, CD44, además de factores de transcripción como Sox2, Oct4, Nanog, y la enzima ALDH (Aldehido Deshidrogenasa) (Brungs et al., 2016; X. Zhang et al., 2016). En relación con lo anterior, de acuerdo con el estudio llevado a cabo por Nguyen et al., los marcadores con mayor especificidad para la identificación de CTCGs son CD44 y ALDH (Nguyen et al., 2017). El uso de marcadores para la identificación de CTCGs ha permitido su estudio a nivel clínico, asociándose la presencia de CTCGs con variables clínico-patológicas de relevancia en pacientes con CG. Por ejemplo, se ha reportado que la presencia de células CD44⁺ se asocia con invasión a nódulos linfáticos, mayor estadio tumoral, y menor sobrevida (Wakamatsu et al., 2012).

1.2.3 Resistencia a tratamientos

La relevancia que han obtenido recientemente las CTCs no solo se deriva de su relación con variables clínico-patológicas, como ya se ha comentado, sino también de varias de sus características funcionales como lo es la resistencia a tratamientos anti-neoplásicos. En este sentido, usando líneas celulares de CG con resistencia inducida a cisplatino se ha observado que hay un incremento en

CTCs (fenotipo CD133⁺), sin embargo, tras el silenciamiento de CD133 mediante shRNAs se revierte dicha resistencia al quimioterapéutico (Lu et al., 2019).

Esta resistencia a tratamiento en CTCs se deriva de múltiples mecanismos no excluyentes ni exclusivos. Entre los principales mecanismos de resistencia podemos destacar la producción de factores anti-apoptóticos (Bcl-2, c-FLIP, IAPs) y la activación de vías de señalización asociadas con la supervivencia y proliferación celular (Notch, Sonic Hedgehog, NF- κ B, Wnt, etc.), una incrementada respuesta al daño en el ADN, el establecimiento de un estado de quiescencia que alterna dinámicamente con la proliferación de CTCs, además de la actividad detoxificante que se llevan a cabo por transportadores tipo ABC, enzimas como ALDH, PERK/Nrf2, entre otros (R Safa, 2020).

Otros mecanismos de resistencia a tratamiento en CTCs se derivan de su interacción con el microambiente, por ejemplo, se ha reportado que fibroblastos asociados a cáncer (FACs, Fibroblastos Asociados a Cáncer) son capaces de liberar exosomas cargados con ARN-no codificante (H19) que estimulan la vía Wnt/ β -catenina en CTCs, incrementando su quimiorresistencia, metástasis y proliferación (Ren et al., 2018). De manera similar, se ha reportado que leucocitos como MATs (Macrófagos Asociados a Tumor), neutrófilos asociados a tumor, y linfocitos Th17, son capaces de inducir TEM (Bie et al., 2017; Jiang et al., 2017; Li et al., 2019; W. Zhang et al., 2017). Esto resulta de gran relevancia ya que se ha comprobado que la TEM puede dar paso a la formación de tumor-esferas y la expresión del marcador CD44 [46].

1.3 CD44

1.3.1 Estructura y Gen de CD44

Como se ha discutido, CD44 es una proteína de gran relevancia en las CTCs, por lo que su estudio a profundidad es de gran interés para la presente investigación. CD44 es una glucoproteína encontrada en la superficie celular de diversos tejidos sanos como en pulmón, epidermis y sistema nervioso central, cuya funciones principales son la adhesión celular, ensamble con la matriz extracelular, migración celular, entre otras funciones que se discutirán a profundidad en los siguientes apartados. Esta proteína tiene una masa molecular de entre 85 y 250 kDa, según el tipo de isoforma, siendo codificada esta proteína por un solo gen localizado en humanos dentro del cromosoma 11, locus 11p13, compuesto por 20 exones (Figura 3A) (Guo et al., 2021). De estos 20 exones, es posible la generación de múltiples isoformas a través del *splicing* alternativo, entre las cuales destaca por frecuencia la isoforma estándar de CD44 (CD44s) constituida por 9 exones. Es

posible la generación de distintas variantes de CD44 (CD44v2-10) constituidas por los exones codificantes para CD44s y uno o más exones variantes, proceso regulado mediante la proteína ESRP1 (del inglés *Epithelial Splicing Regulatory Protein 1*) (C. Chen et al., 2018). CD44 se compone por un dominio extracelular de unión a ligandos, un dominio proximal a la membrana celular externa (variable debido a las isoformas), un dominio transmembrana y uno citoplasmático (Figura 3A) (Senbanjo & Chellaiah, 2017).

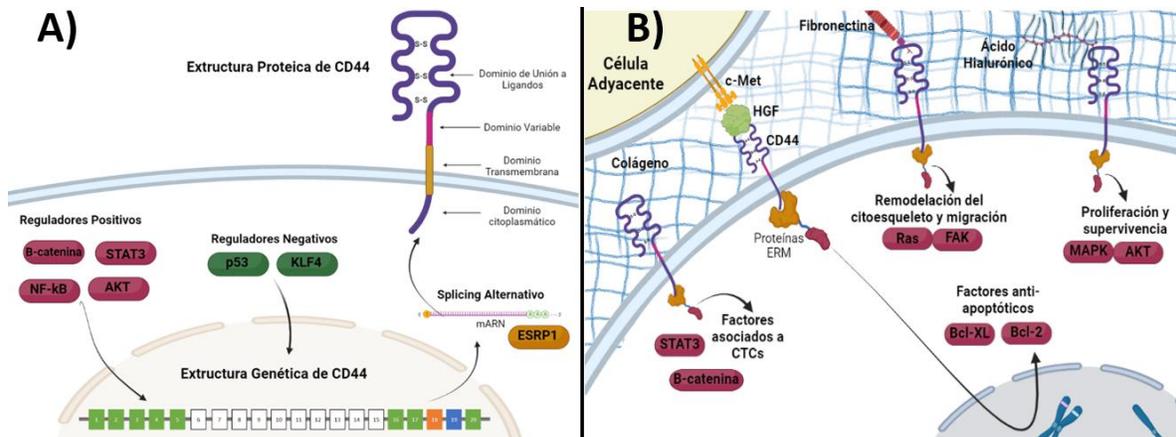


Figura 3. Estructura, regulación y función de CD44. A) La estructura de CD44 se compone por 4 dominios, codificados por *splicing* alternativo de sus 20 exones constantes, siendo regulado este proceso por la proteína ESRP1. Se observan en color verde los exones codificantes para CD44s, en blanco los exones codificantes para las variantes, en naranja el exón codificante para la región transmembrana, y en azul el exón 19 regularmente sin expresión. Además, existen diversos reguladores que promueven o restringen la expresión de CD44. B) La interacción de CD44 con sus ligandos activa vías de señalización intracelular relacionadas con la remodelación del citoesqueleto, migración, proliferación, supervivencia y troncalidad. CD44 es capaz de asociarse a HGF mediando con ello la activación de c-Met en células adyacentes. HGF: Hepatocyte Growth Factor, CTCs: Células Troncales Cancerosas, EZM: *Ezrin-Radixin-Moesin*. Figura creada en Biorender.

1.3.2 Regulación de CD44

Respecto a su regulación transcripcional, se sabe que el promotor de CD44 carece de secuencias consenso TATA o CCAAT, sin embargo, rio arriba del promotor se encuentran 3 copias del exanucleótido GGGGGG que permiten la unión del factor de transcripción Sp1 para el ensamble de la maquinaria de transcripción (Shtivelman & Bishop, 1991).

Existen proteínas y vías de señalización que regulan positivamente la expresión de CD44 como el factor NF-κB, la vía β-catenina/TCF y AKT. Entre las señales que regulan negativamente la expresión de CD44 se encuentran p53 y el factor KLF4, siendo este último de gran importancia ya que también induce la transición mesenquimal-epitelial (TME), lo cual permite percibir la relación entre CD44 y la dualidad TEM-TME (Figura 3A) (Y. Yan et al., 2016). Adicionalmente se ha reportado que CD44 es

regulado negativamente por miRNAs (del inglés *micro Ribonucleic Acid*) como miR-34a, miR-143 y miR-328 debido a la unión entre dichos miRNAs y el sitio 3'-UTR del mRNA de CD44 (C. Chen et al., 2018).

1.3.3 Interacciones intra y extracelulares de CD44

CD44 interactúa tanto con elementos extracelulares como intracelulares. A nivel extracelular se une principalmente a elementos de la matriz extracelular como el ácido hialurónico, osteopontina, condroitina, colágeno, y fibronectina, lo que promueve cambios conformacionales en CD44. Estos cambios conformacionales en CD44 favorecen la unión citoplasmática de moléculas adaptadoras, permitiendo con ello la activación de vías de señalización río abajo (H. Xu et al., 2020). Un ejemplo de estas proteínas adaptadoras son el grupo proteico ERM (del inglés *Ezrin-Radixin-Moesin*), el cual tras unirse al dominio citoplasmático de CD44 y a cadenas de actina en el citoesqueleto promueve la activación de la proteína Ras que puede activar a su vez vías asociadas con crecimiento/proliferación (como la vía MAPK) o con remodelación del citoesqueleto (como la vía Rho/Rac) (Orian-Rousseau et al., 2007).

La unión entre CD44 y sus ligandos extracelulares puede favorecer actividades pro-tumorales (Figura 3B) como es el caso de la unión entre ácido hialurónico y CD44, que permite la activación de vías de señalización como Ras, PI3K/Akt y MAPK, favoreciendo la TEM y la quimiorresistencia (L. Lv et al., 2016). Respecto a la quimiorresistencia inducida por la interacción CD44-hialuronato, parece deberse en parte a que se estimula la sobre-expresión de proteínas de la familia MDR (del inglés *Multidrug Resistance Gene*), ampliamente conocidas por su actividad exportadora de quimioterapéuticos en células tumorales (Guo et al., 2021). De manera similar, en cáncer de mama CD44 se ha visto relacionado con la expresión y activación de proteínas que intervienen en el crecimiento y diferenciación celular como cAbl, Jak y ERK1/2, así como con proteínas asociadas a migración celular como por ejemplo c-Src, paxilina y FAK (Nam et al., 2015). Finalmente, se ha observado que CD44 regula negativamente la expresión de factores pro-apoptóticos como Fas, Bcl-2/Bcl-xL, y las caspasas 3/9, además de favorecer la expresión de factores anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL (C. Chen et al., 2018).

Es importante destacar que CD44 es capaz de regular la actividad de β -catenina mediante interacción proteína-proteína y STAT3 por mecanismos aún no bien descritos, ambos factores estrechamente relacionados con CTCs, controlando con ello acciones como la diferenciación y proliferación celular, el metabolismo tumoral, la TEM y la resistencia a quimioterapéuticos (Khurana

et al., 2013; Nam et al., 2015; Roy et al., 2020). De forma similar pero mediante un mecanismo de acción aún más interesante, a través de una ruptura proteolítica del dominio intracelular de CD44 llevado a cabo por enzimas como la γ -secretasa, es posible la generación de un dominio intracelular escindido que estimula la expresión del factor HIF-1 α (del inglés *Hypoxia Inducible Factor-1 α*), Sox2, Oct4 y Nanog, favoreciendo a través de este mecanismo la formación de tumor-esferas en un modelo de cáncer de mama (Cho et al., 2015; Miletti-González et al., 2012).

Por otra parte, además de las señalizaciones intracelulares que se generan tras la interacción de CD44 con sus ligandos, existen diversos mecanismos por los cuales CD44 puede ser efector de múltiples acciones en células adyacentes o la matriz extracelular. Al respecto, se ha descrito que la unión entre MMP-9 (del inglés *Matrix Metalloproteinase-9*) y CD44 ayuda a localizar a esta metaloproteinasa en la superficie celular para favorecer la degradación de matriz extracelular, y con ello promover la invasión de células de cáncer de mama y melanoma (Q. Yu & Stamenkovic, 1999). Por otra parte, CD44v6 es capaz de unirse al HGF (del inglés *Hepatocyte Growth Factor*), conocido ligando de c-Met (factor asociado con tumorigenicidad y metástasis), por lo que tras la unión CD44v6-HGF se puede estimular indirectamente la activación de c-Met en células adyacentes, induciéndose la proliferación y migración (Figura 3B). Cabe destacar que este último mecanismo ha sido aprovechado por terapias con anticuerpos monoclonales anti-CD44v6 que buscan bloquear la activación de c-Met a través de este mecanismo dependiente de CD44v6 (C. Chen et al., 2018).

1.4 CD44v6

Como previamente se comentó, el splicing alternativo de CD44 puede dar origen a distintas isoformas según sea el exón variante que se integre en el mRNA maduro. Si bien la mayoría de las variantes de CD44 han mostrado asociación clínica con variables de relevancia en diferentes modelos de cáncer, la asociación con CTCs no se ha observado en todas las variantes (Tempfer et al., 1996; B. Yan et al., 2020). Entre las variantes de CD44 que muestran relación con propiedades de CTCs se encuentran CD44v3, CD44v6, CD44v9 y CD44v8-10 (Lau et al., 2014; Suwannakul et al., 2020; Todaro et al., 2014; Todoroki et al., 2016), siendo CD44v6 una de las más estudiadas. CD44v6 se ha asociado con CTCs en páncreas, cáncer colorrectal, de cabeza y cuello, sistema nervioso central, así como en cáncer gástrico (Lobo et al., 2020; Toden et al., 2019; Yanamoto et al., 2014).

La importancia de un estudio específico de las variantes de CD44 se debe a que dichas variantes muestran diferencias estructurales y funcionales con respecto a CD44s, teniendo mayor o menor

afinidad hacia ciertos ligandos extracelulares. Es decir que, las distintas variables de CD44 siguen siendo capaces de unirse a todos los ligandos previamente mencionados, pero puede cambiar su afinidad hacia cada uno, y con ello su asociación con las funciones ya comentadas de CD44. Por ejemplo, se sabe que CD44v6 tiene mayor afinidad con ligandos como c-Met y VEGFR-2 (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), encontrándose principalmente relacionada con la migración de células tumorales (K. L. Chen et al., 2020).

1.4.1 CD44v6 y CTCs

En cuanto a la asociación de las variantes de CD44 y las CTCs, es un aspecto complejo. En cáncer de mama se ha comprobado que tras impedir la producción de variables de CD44, mediante la inhibición de ESRP1 (regulador del *splicing* alternativo de CD44), se favorece una mayor presencia de CD44s y con ello se promueve la aparición de CTCs, mientras que cuando se favorece la presencia de variantes de CD44 se pierden dichas propiedades de troncalidad (H. Zhang et al., 2019). A pesar de este hecho, en modelos *in vitro* de CG y colorrectal se ha visto que la variable CD44v6 se asocia estrechamente a características de CTCs como una alta clonogenicidad, un elevado número de tumor-esferas dentro de cultivos 3D, TEM, alta tumorigenicidad, así como migración e invasión celular (Lobo et al., 2020; Toden et al., 2019). Además, la expresión de CD44v6 en CG parece ser inducida por la activación de STAT3, vía asociada a CTCs, lo que produce resistencia a cisplatino (Pereira et al., 2020). Es entonces que dada la estrecha relación de CD44v6 con propiedades de troncalidad en CG, múltiples trabajos proponen a este como un marcador de CTCGs (Bagheri et al., 2022; Lobo et al., 2020; Yasui et al., 2020). Debido a lo anterior, no está claro si solo algunas variables de CD44 (como CD44v6) se asocian a CTCs, y/o si la función de las variables de CD44 dependen del modelo de cáncer que se estudie.

1.4.2 CD44v6 y cáncer gástrico

La relevancia de CD44v6 en la progresión del CG se puede observar también a nivel clínico, donde además de encontrarse sobre-expresado se ha asociado con el grado de diferenciación tumoral, invasión a nódulos linfáticos, metástasis a distancia, estadio tumoral TNM y con una menor supervivencia (Fang et al., 2016; Y. Y. Xu et al., 2017). Además de esto, se ha visto que CD44v6 es de gran importancia en lesiones premalignas de CG, ya que su presencia se encuentra incrementada en lesiones metaplásicas y displásicas en el tejido gástrico (Da Cunha et al., 2010). En este mismo sentido, ensayos con organoides de tejido gástrico sano han mostrado que *H. pylori* induce

proliferación celular y TEM en epitelio gástrico a través de un mecanismo dependiente de CD44v6, que se sugiere es debido a la interacción entre CD44v6 y c-Met (Bertaux-Skeirik et al., 2015).

1.5 Terapias contra CTCs

Dadas las relevantes propiedades de las CTCs, así como la asociación de esta subpoblación tumoral y sus marcadores de identificación con variables clínico-patológicas de relevancia en cáncer, se han generado diversas estrategias terapéuticas cuyo objetivo es la eliminación o limitación de las actividades tumorales de CTCs. Entre los enfoques terapéuticos anti-CTCs descritos se encuentran principalmente la terapia dirigida, así como la inmunoterapia basada en células inmunes activadas y anticuerpos monoclonales, sin embargo, la mayoría de estas terapias se encuentran aún en fases preclínicas o clínicas tempranas (Zhou et al., 2021).

Entre los fármacos de terapia dirigida podemos encontrar inhibidores de STAT3 en cáncer colorrectal (Fase 3), inhibidor de la vía Sonic Hedgehog en cáncer de páncreas (Fase 2), inhibidor de γ -secretasa (esencial para la activación de Notch) en cáncer de mama (Fase 2), inhibidor de la vía Nanog en cáncer hepatocelular, así como el inhibidor del receptor Wnt o de β -catenina en cáncer de páncreas (Fase 1) (Desai et al., 2019).

En cuanto a la terapia basada en anticuerpos monoclonales podemos encontrar anticuerpos contra CD44v6 en cáncer de cabeza y cuello, EpCAM en cáncer de próstata, LGR5 en cáncer colorrectal, CD123 en leucemia linfoblástica aguda, entre otros (L. Yang et al., 2020). De forma similar, en la última década se han generado diversos estudios que aplican inmunoterapia celular contra CTCs como lo es el uso de CAR-Ts (del inglés *Chimeric Antigen Receptor T cells*) dirigidos frente a EpCAM en cáncer de mama, CD133 en glioblastoma, CD54 en cáncer gástrico, y CD117 en leucemia mieloide aguda (Masoumi et al., 2021; L. Yang et al., 2020), de los cuales se profundizará más en el siguiente apartado.

1.6 CAR-Ts

La terapia basada en CAR-Ts consta de linfocitos T modificados genéticamente para expresar CARs (del inglés *Chimeric Antigen Receptors*), receptores que permiten el reconocimiento y eliminación de células portadoras del antígeno objetivo de una manera independiente al MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*). Como terapia anti-neoplásica, el CAR suele diseñarse para reconocer neoantígenos o antígenos sobre-expresados en el tejido tumoral, de modo que cuando los CAR-Ts

encuentran el antígeno objetivo son capaces de reconocerlo y activarse para ejercer funciones pro-inflamatorias contra el tumor (Fischer, 2021).

1.6.1 Activación de Linfocitos T

A pesar de que los CAR-Ts son linfocitos T, la presencia del CAR les brinda notables diferencias en el proceso de activación, por lo que resulta relevante hacer un breve recordatorio de la normal activación de linfocitos T. Inicialmente, es importante entender el proceso secuencial mediante el cual se da la respuesta inmune de linfocitos T. Una vez que un macrófago/célula dendrítica (CPAs, Células Presentadoras de Antígenos) ha procesado un patógeno o célula tumoral se dirige hacia nódulos linfáticos donde procede a la presentación de antígenos hacia linfocitos T nativos, proceso que da lugar a la activación del linfocito. A continuación, el linfocito T activado sufre expansión clonal y diferenciación celular hacia fenotipos efectores o de memoria. Los fenotipos efectores se dirigen mediante quimiotaxis hacia el sitio de inflamación donde realizan acciones efectoras dependientes del tipo de linfocito T (Figura 4A). Por ejemplo, linfocitos CD4+ liberan citocinas pro-inflamatorias (que dependerán del subtipo Th1, Th2, Th17, etc.), activan macrófagos y linfocitos B, e incluso tienen ligera actividad citotóxica. Por su parte, linfocitos T CD8+ tienen actividades principalmente citolíticas mediadas por granzima, perforina, el ligando FasL, aunque también liberan citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2, así como diversas quimiocinas que reclutan otros leucocitos (Murphy et al., 2017).

Dentro de este proceso, los linfocitos T son células que pueden responder solo a un antígeno en específico. La especificidad de esta respuesta viene dada por el TCR (del inglés *T Cell Receptor*), receptor a través del cual la célula T reconoce su antígeno específico. En la mayoría de los linfocitos T el TCR se encuentra formado por un heterodímero entre cadenas polipeptídicas α y β , cadenas que a su vez se componen por una región citoplásmica que permite activar al linfocito T, una región transmembrana, una región extracelular constante y una región extracelular variable, siendo esta última la que permite reconocer el antígeno objetivo (Chronister et al., 2021). Sin embargo, el TCR no es capaz de reconocer su antígeno objetivo de forma directa, el reconocimiento del antígeno requiere que una CPA presente el antígeno con ayuda de su MHC (Figura 4A). De esta manera, el TCR reconoce al complejo antígeno:MHC procediendo a una fosforilación de la proteína CD3 ζ (adyacente al TCR), siendo esta última la que activa la cascada de señalización dentro del linfocito (Tai et al., 2018).

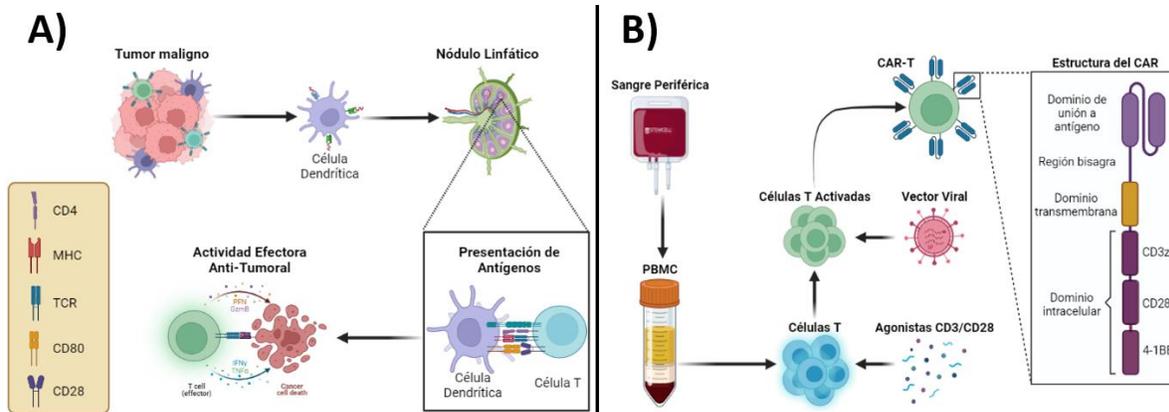


Figura 4. Actividad inmunológica de células T y CAR-Ts. A) Los linfocitos T interactúan con CPAs, activándose a través de la interacción MHC:TCR y el uso de correceptores. B) La producción de CAR-Ts se realiza a partir de células T humanas, las cuales serán modificadas genéticamente para la introducción del receptor tipo CAR conformado por 4 regiones principales. *Figura creada en Biorender.*

Resulta importante resaltar que la mayoría de las células tienen MHC, por lo que son capaces de presentar antígenos, sin embargo, varía el tipo de MHC que contienen en su superficie. Al respecto, todas las células nucleadas son capaces de expresar MHC tipo I, que interactúa con la molécula CD8 en linfocitos T citotóxicos, pero solo las CPA son portadoras de MHC tipo II, que interactúa con la molécula CD4 de linfocitos T *helper* (Murphy et al., 2017). Es entonces que durante la presentación de antígenos no solo interactúan TCR:antígeno:MHC, también se involucran otros receptores llamados co-estimulantes, los cuales apoyan a la activación de los linfocitos T. Cada receptor de co-estimulación en el linfocito T tiene su ligando específico en la célula presentadora de antígenos, siendo algunos ejemplos de receptor co-estimulante:ligando los siguientes: CD28:B7, 4-1BB:4-1BBL, OX40:OX40L, ICOS:B7-H2, CD2:CD58, entre otros. De igual manera, cuando los receptores de co-estimulación interactúan con su ligando generan señales dentro del linfocito T, por lo que se pueden diferenciar dos señales necesarias para la total activación del linfocito T, señal 1 proveniente de la activación TCR/CD3 ζ y señal 2 proveniente del receptor de co-estimulación (Figura 4A). Cabe recalcar que se requieren ambas señales para la correcta activación del linfocito T (L. Chen & Flies, 2013; Murphy et al., 2017).

La activación del TCR/CD3 ζ y de co-estimuladores como CD28 genera activación de vías de señalización intracelular como PI3K/Akt, NF- κ B, PKC, Ras/MAPK, NFAT, que en conjunto explican las actividades posteriores de linfocitos T activos como la liberación de citocinas y agentes citotóxicos, el crecimiento celular y proliferación clonal, prolongación de la supervivencia celular, diferenciación celular (L. Chen & Flies, 2013).

1.6.2 Estructura y Activación del CAR

Como ya se ha mencionado, los CAR-Ts presentan diferencias funcionales con respecto a las células T, esto viene dado por la estructura del receptor tipo CAR que se introduce mediante modificación genética. A continuación, se describe la estructura de los CARs, así como su funcionamiento dentro de los CAR-Ts.

Los CARs son receptores sintéticos que se componen de forma clásica por 4 regiones: 1) dominio extracelular de unión a antígeno, 2) región de bisagra, 3) dominio transmembrana, y 4) dominio intracelular (Figura 4B) (Sterner & Sterner, 2021). De manera común, el dominio extracelular de unión a antígeno en los CARs se asemeja al fragmento variable de un anticuerpo monoclonal, teniendo una cadena variable pesada y una ligera que, unidas mediante un péptido, permiten el reconocimiento directo de un antígeno, por lo que la activación del CAR se realiza tras la unión con su antígeno específico sin la necesidad de la interacción MHC:TCR (Feins et al., 2019). Entre el dominio extracelular y el transmembrana de los CARs existe una región bisagra que brinda flexibilidad al CAR para facilitar la identificación de su epítotope. Esta región bisagra suele derivarse de receptores como CD8, CD28, o anticuerpos IgG. En cuanto al dominio transmembrana, suele derivarse de receptores CD3 ζ , CD28, CD4 o CD8 α , siendo de importancia debido a que puede influir en la estabilidad del CAR, su activación y su expresión (Xin et al., 2022).

Finalmente, la estructura intracelular de los CARs se compone de un dominio de señalización intracelular CD3 ζ con la opcional presencia en tandem de 1-2 dominios de co-estimulación como CD28, 4-1BB, ICOS, CD40, CD27, MYD88, OX40, principalmente (Feins et al., 2019). Según el número de dominios intracelulares en el CAR pueden distinguirse 3 generaciones de CAR-Ts (Kim & Cho, 2020):

- Primera generación: Solo presenta un dominio CD3 ζ .
- Segunda generación: Presenta un dominio CD3 ζ y un dominio de co-estimulación, regularmente suele ser CD28 o 4-1BB.
- Tercera generación: Se caracteriza por un dominio CD3 ζ y 2 dominios de co-estimulación, siendo usuales las combinaciones CD3 ζ -CD28-OX40 y CD3 ζ -CD28-41BB.

Adicionalmente existe una cuarta generación de CAR-Ts cuya principal característica es la presencia de un segundo transgén que permite la síntesis y liberación de proteínas como IL-2, producto que tras ser liberado dentro del microambiente tumoral apoyará en la eliminación de células tumorales.

Recientemente, una quinta generación de CAR-Ts se encuentra en desarrollo teniendo como característica la presencia de un dominio intracelular de IL-2RB que permite la activación de señales JAK/STAT, favoreciendo la proliferación y persistencia de los CAR-Ts (Mehrabadi et al., 2022).

De esta manera, todas las generaciones de CAR-Ts contienen CD3 ζ por lo que pueden activar proteínas de señalización como la fosfolipasa C- γ , NFAT, PKC, c-Fos, c-Jun, t-bet, que según su fenotipo celular podrían permitir la síntesis de IL-2, IFN- γ , granzima, perforina, la activación de los linfocitos y migración celular por remodelación del citoesqueleto (Glimcher et al., 2004). Adicionalmente, las señales de co-estimulación (como CD28 y 4-1BB) encontradas a partir de la segunda generación de CAR-Ts permite activar vías de señalización como PI3K/Akt, NF- κ B, y MAPK para con ello favorecer la supervivencia y proliferación de estos linfocitos, así como la síntesis de otras citocinas pro-inflamatorias (IL-4, IL-5, IFN- γ , así como IL-2) y la expresión del ligando de muerte celular Fas-L (Lindner et al., 2020).

Con lo descrito anteriormente es posible entender que la estructura extracelular del CAR permite reconocer un antígeno tumoral sin la ayuda de células tipo CPA. El reconocimiento del antígeno tumoral genera la señal 1 y 2 necesarias para la activación del CAR-T, estimulando así distintas actividades dependientes del fenotipo celular del linfocito modificado (CD4+ o CD8+, células T de memoria, efectoras, etc.), pero que en conjunto logran generar y amplificar una respuesta inmune frente al antígeno objetivo (Tantalo et al., 2021).

1.6.3 Síntesis de CAR-Ts

Desde 1987 cuando Yoshihisa Kuwana describió por primera vez la tecnología CAR, se han generado notables avances que han culminado en la actual presencia de 5 terapias CAR-T aprobadas por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) (Xin et al., 2022). Estos avances han permitido la estructuración de metodologías ampliamente aceptadas para la generación de CAR-Ts a nivel laboratorio y clínico, las cuales integran los siguientes pasos (Figura 4B):

1. Leucaféresis: A nivel clínico, mediante leucaféresis es posible el aislamiento automatizado de PBMC (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) regularmente desde la sangre del paciente con cáncer (tratamiento autólogo), aunque también es posible extraerlos desde donadores sanos (tratamiento alogénico). Durante ensayos preclínicos suelen extraerse PBMC mediante centrifugación por gradiente de densidad usando reactivos como Ficoll o Lymphoprep (Fesnak & O'Doherty, 2017).

2. Aislamiento de linfocitos T: Opcionalmente es posible purificar los linfocitos T a partir de las PBMC mediante distintos métodos, aunque es frecuente el uso de perlas magnéticas ancladas a anticuerpos que permiten la selección positiva o negativa de la población de interés (X. Wang & Rivière, 2016).
3. Activación de linfocitos T: Si bien *in vivo* este proceso se lleva a cabo por la interacción linfocito T:CPA dentro del nódulo linfático, *in-vitro* suele realizarse con anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-CD3/anti-CD28 que activan sus respectivos receptores en linfocitos T. Este proceso es necesario no solo para la expansión clonal de linfocitos T, sino también para la transducción (Vormittag et al., 2018).
4. Modificación genética de linfocitos T: Existen distintas maneras de introducir el transgén dentro de los linfocitos activados, usándose regularmente métodos para la expresión estable del transgén como por ejemplo vectores retrovirales, vectores lentivirales, o sistemas transposón/transposasa, sin embargo, a nivel preclínico es frecuente el uso de métodos transitorios como transfección con mRNA codificante para el CAR (X. Wang & Rivière, 2016).
5. Expansión de CAR-Ts: La expansión de CAR-Ts a nivel clínico suele realizarse mediante biorreactores para una expansión a gran escala, sin embargo, se siguen principios básicos similares a los llevados a cabo en ensayos preclínicos, como el mantenimiento de temperatura, CO₂, O₂, nutrientes, así como la estimulación con citocinas que favorecen la proliferación como IL-2, IL-15, IL-21 (X. Wang & Rivière, 2016).
6. Formulación y criopreservación: Posterior a la expansión suelen realizarse procesos de lavado para retirar reactivos y otras impurezas de los CAR-Ts, para finalmente congelarse hasta su utilización (Vormittag et al., 2018).

Si bien este procedimiento resulta extenso, existen equipos automatizados como el *CliniMACS Prodigy*[®] que a partir de sangre periférica de paciente realiza secuencialmente todos los pasos para la producción de CAR-Ts dentro de un sistema cerrado, logrando la terapia personalizada en alrededor de 15-18 días o incluso menos si el periodo de expansión (13 días) se reduce (Alzubi et al., 2021).

1.6.4 Efectividad de CAR-Ts como terapia anti-neoplásica

Si bien existen 6 terapias CAR-T aprobadas por la FDA, la mayor parte de los conocimientos que se tienen sobre la efectividad de esta terapia proviene de ensayos en fases clínicas iniciales o

intermedias (NCI, 2022). Entre los meta-análisis disponibles que evalúan la efectividad de este tipo de terapia destaca el de Yu & Hua (2019) por su alto número de ensayos contemplados (comparado con sus homólogos), donde se describe que de los 997 pacientes tratados con CAR-Ts se obtuvo una ORR (del inglés *Overall Response Rate*) del 56% (95% IC: 46-66%), sin embargo, se observaron fuertes diferencias entre pacientes con neoplasias hematológicas y de tumores sólidos, reportándose ORR de 71% (95% IC: 62-79%) y 20% (95% IC: 11-34%), respectivamente (W. L. Yu & Hua, 2019).

Tabla 1. Terapias CAR-T aprobadas por la FDA.

Nombre genérico	Antígeno objetivo	Tipo de cáncer objetivo	Población de pacientes
Tisangelecleucel	CD19	Leucemia linfoblástica aguda de células-B (LLA de células-B)	Niños y adultos jóvenes
		Linfoma No-Hodgkin de células-B	Adultos
Axicabtagene cicleucel	CD19	Linfoma No-Hodgkin de células-B (LNH de células-B)	Adultos
		Linfoma folicular	Adultos
Brexucabtagene	CD19	Leucemia linfoblástica aguda de células-B	Adultos
		Linfoma de células de Mantle	Adultos
Lisocabtagene maraleucel	CD19	Linfoma No-Hodgkin de células-B	Adultos
Idecabtagene vicleucel	BCMA	Mieloma múltiple	Adultos
Ciltacabtagene autoleucel	BCMA	Mieloma múltiple	Adultos

Tabla obtenida y modificada de (NCI, 2022).

1.6.5 Limitaciones de la terapia CAR-T

Dentro de los aspectos que limitan la efectividad de la terapia CAR-T, existen causas diversas. Una causa que explica parcialmente la menor efectividad de CAR-Ts en tumores sólidos es la dificultad de atravesar barreras físicas para acceder al tumor. Ejemplo de lo anterior podría ser la barrera hematoencefálica que dificultaría la infiltración de CAR-Ts en el tratamiento de tumores del sistema nervioso central, siendo interesante que en modelos preclínicos la inyección intratecal de los CAR-Ts mejora notablemente su eficiencia contra glioblastoma (Sternner & Sternner, 2021). De manera similar, la baja infiltración de los CAR-Ts puede deberse a una liberación reducida de quimiocinas por parte del tumor, o bien una baja respuesta de los CAR-Ts a las mismas. En este sentido, se han

diseñado CAR-Ts que sobre-expresan el receptor CXCR2 (receptor de IL-8), favoreciéndose así la quimiotaxis de los CAR-Ts y con ello la efectividad del tratamiento (Whilding et al., 2019).

Las características del microambiente tumoral resultan de gran relevancia, pudiendo incluso funcionar como herramientas para la evasión inmune contra CAR-Ts. Al respecto, existe una amplia variedad de células que componen el microambiente tumoral y favorecen la evasión inmune, por ejemplo, MATs tipo M2, neutrófilos tipo N2, FACs, linfocitos T_{reg}, células troncales mesenquimales, e incluso ciertas subpoblaciones de células neoplásicas (Mehrabadi et al., 2022). Estos componentes del microambiente tumoral inhiben la activación de los CAR-Ts o bien generan agotamiento en su actividad, esto a través de mecanismos como los *checkpoints* inmunológicos, donde se activan receptores como PD-1 o CTLA-4 en los CAR-Ts, promoviendo así la inactivación del linfocito, senescencia o la generación de fenotipos reguladores. Derivado de ello, la asociación terapéutica de CAR-Ts y bloqueadores de *checkpoints* inmunológicos ha resultado en mejores respuestas a tratamiento para pacientes con leucemia linfoblástica aguda (Grosser et al., 2019). Por otra parte, también es posible que el secretoma del microambiente se componga de citocinas que generan disfunción en CAR-Ts, como lo es el TGF- β , citocina que inhibe la proliferación de los CAR-Ts e induce fenotipos similares a T_{reg} (Rodríguez-García et al., 2020).

Así mismo, la expresión tumoral del antígeno objetivo es determinante para la actividad oncolítica de los CAR-Ts. Es importante tener en cuenta que el tratamiento con CAR-Ts puede generar presión para la aparición o supervivencia de clones tumorales deficientes del antígeno objetivo, generándose resistencia al tratamiento por la misma causa (Feins et al., 2019). De igual forma, la heterogeneidad celular de los tumores hace posible que la expresión del antígeno objetivo sea variable dentro de las poblaciones de células neoplásicas, por lo que no todas las células tumorales serán blancos terapéuticos. Por lo tanto, se recomienda tener un antígeno objetivo presente de manera amplia en las células tumorales o bien que esté presente en subpoblaciones claves dentro de la progresión tumoral. Sin embargo, la elección del antígeno objetivo deberá preservar un alto grado de especificidad para evitar, en medida de lo posible, efectos adversos derivados del daño a tejido sano que también expresa el antígeno objetivo (Mehrabadi et al., 2022).

La especificidad de los CAR-Ts es imprescindible ya que de otra forma los efectos adversos del tratamiento pueden ser incluso mortales. Entre los principales efectos adversos derivados de este tipo de terapia se encuentran el síndrome por liberación de citocinas, causante de falla multiorgánica e inestabilidad cardiorrespiratoria, cuya frecuencia en tumores sólidos es del 5% pero

en neoplasias hematológicas puede alcanzar hasta el 55% de los casos. Otros efectos secundarios frecuentes son el síndrome de neurotoxicidad (12-37%), infecciones (12-14%) y citopenia (Grigor et al., 2019).

1.6.6 CAR-Ts como terapia contra CTCs

Según lo mencionado en el apartado anterior, la excesiva actividad inflamatoria de los CAR-Ts puede generar efectos adversos mortales. Por lo tanto, sería de relevancia una terapia CAR-T que pudiera generar actividad inflamatoria de baja intensidad, pero de alta eficiencia anti-tumoral. Al respecto, diversos autores proponen que esto pudiera ser posible dirigiendo CAR-Ts hacia subpoblaciones tumorales de bajo número de células, pero con funciones clave en el mantenimiento y progresión del cáncer. En este sentido, el enfoque de la terapia CAR-T para la eliminación de CTCs es una propuesta que cumple las especificaciones antes mencionadas, además de establecer como blanco a una población típicamente resistente a terapias anti-neoplásicas convencionales. Actualmente existen múltiples ensayos clínicos, la mayor parte de ellos en fase I, con CAR-Ts dirigidos contra marcadores de CTCs como CD133, CD20, EpCAM, CD38, CD123, etc (Masoumi et al., 2021).

En el CG existen pocos avances en la terapia con CAR-Ts, por ejemplo, a nivel preclínico se ha demostrado que el uso de CAR-Ts contra ICAM-1, conocido marcador de CTCGs, limita el crecimiento tumoral y aumenta la sobrevida de modelos murinos con CG, sin embargo, su asociación con paclitaxel genera remisión total o parcial de la enfermedad, mejorando aún más la sobrevida (Jung et al., 2020). De forma similar, en el trabajo de Yang et al. (2021) se reporta la generación de CAR-Ts biespecíficos dirigidos contra los marcadores de CTCGs EpCAM e ICAM-1, mostrando capacidad de eliminar células de CG con alta heterogeneidad (incluso EpCAM negativos), además de lograr remisión completa de la enfermedad en 80% de los ratones, mínima reincidencia tumoral y elevada sobrevida (Y. Yang et al., 2021).

Finalmente, CAR-Ts contra CD44v6 han sido desarrollados contra leucemia mieloide aguda, reduciendo eficientemente el número de células neoplásicas circulantes en modelos murinos. Interesantemente, en este mismo trabajo se evaluó la expresión de CD44v6 en 47 tipos de tejido humano sano, siendo indetectable en todos los tejidos excepto en piel y mucosa oral. Sin embargo, mediante co-cultivos se confirmó que los CAR-Ts anti-CD44v6 no generan actividad citotóxica contra cultivos primarios de queratinocitos (Casucci et al., 2013). Lo anterior parece apoyar la premisa de que CD44v6 podría ser un marcador con alta especificidad al usarse como blanco terapéutico.

Por lo tanto, tomando en cuenta que el marcador CD44v6 se asocia con CTCGs, es posible que la generación de CAR-Ts dirigidos contra este marcador pudiera brindar una opción terapéutica eficiente, específica, y con pocos efectos adversos para la eliminación de CTCGs, y con ello un avance en el tratamiento contra el CG.

2. Planteamiento del Problema

El CG es una de las neoplasias con mayor incidencia en México y a nivel mundial, destacando además por su alta mortalidad y recurrencia. La poca efectividad de los tratamientos actuales, y otros aspectos relacionados con la progresión del CG, pueden explicarse en parte por la existencia de las llamadas CTCGs, una subpoblación tumoral con características troncales, elevada capacidad metastásica y resistencia a terapias convencionales. Ante esta resistencia a tratamiento que caracteriza a las CTCGs, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas para su eliminación entre las cuales destaca la inmunoterapia basada en CAR-Ts.

La correcta elección del antígeno objetivo para los CAR-Ts es de vital importancia, ya que determinará su eficiencia terapéutica y la intensidad de sus efectos adversos. El marcador CD44v6 permite la identificación de CTCGs y se encuentra poco expresado en tejidos sanos, por lo que su uso como blanco terapéutico en el tratamiento con CAR-Ts podría permitir la eliminación de CTCGs con limitados efectos adversos en los pacientes con CG.

3. Objetivos

Objetivo General

- Generar linfocitos T con receptor quimérico anti-CD44v6 capaces de eliminar *in vitro* células de cáncer gástrico.

Objetivos Específicos

- Producción de un vector lentiviral con el transgén codificante para el receptor quimérico anti-CD44v6.
- Generar linfocitos T portadores del receptor quimérico anti-CD44v6.
- Evaluar el efecto citotóxico de los CAR-Ts anti-CD44v6 en cultivos celulares de cáncer gástrico.
- Evaluar la citotoxicidad inespecífica de los CAR-Ts anti-CD44v6 en cultivos de células no tumorales.

4. Hipótesis

La actividad citotóxica de los CAR-Ts anti-CD44v6 permitirá la eliminación *in vitro* de células de cáncer gástrico, con un efecto mínimo sobre cultivos de células no tumorales.

5. Metodología

Cultivo Celular

La línea celular AGS-Luc2 (CRL-1739-LUC2) fue adquirida directamente de ATCC, cultivándose en medio F-12K con 10% de suero fetal bovino y blasticidina en concentración final de 8µg/ml. La línea celular HEK293T fue proporcionada por la Dra. Elizabeth Langley del Instituto Nacional de Cancerología (Ciudad de México), cultivándose en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los linfocitos T humanos fueron extraídos de voluntarios sanos, previo consentimiento informado, cultivándose en medio *TexMACS GMP Medium* (Cat. 170-076-306) durante el proceso de activación y expansión; mientras que los co-cultivos se realizaron en presencia del medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los lavados necesarios para eliminar contaminantes o reactivos residuales en linfocitos T se realizaron con buffer compuesto de PBS 1X + albúmina sérica bovina 0.5% + EDTA 2mM.

Plásmido Lentiviral

Se utilizó un plásmido vector lentiviral de 3ª generación tipo pLenti-EF1a-C-mGFP-P2A-Puro sintetizado por OriGene®, en cuya estructura se encuentra la secuencia para el CAR. El gen codificante para el CAR contiene una cadena sencilla del fragmento variable del anticuerpo monoclonal BIWA-8 (anti-CD44v6), seguido de los dominios citoplasmáticos de las proteínas CD28 - 41BB - CD3ζ.

Clonación del Plásmido Lentiviral

Se generaron bacterias *E. coli DH5α* competentes utilizando CaCl₂ 0.1M, las cuales se transformaron usando 15ng/µL de plásmido lentiviral mediante choque térmico para posteriormente cultivarse en placa de agar LB – Cloranfenicol. Tras cultivar la placa 16hrs se realizó el aislamiento y subcultivo de 9 colonias. Se seleccionó una de las colonias subcultivadas para inocularse en medio líquido LB – Cloranfenicol (34µg/ml) durante 16hrs; posteriormente se aisló el plásmido mediante HiPure Plasmid Filter Miniprep Kit. Se buscó confirmar la presencia del plásmido lentiviral en el producto de Miniprep mediante electroforesis, con previa digestión del ADN usando la enzima BamH1 durante 2 horas para linearizar el plásmido y evaluar el peso molecular del mismo (PM esperado = 9,863pb). Posteriormente se cultivaron 200ml de medio líquido LB – Cloranfenicol (34µg/ml) usando 2ml de inóculo. A continuación, se procedió a aislar el plásmido mediante Maxiprep.

Producción y Titulación de Partículas Lentivirales

La producción de partículas lentivirales infecciosas se realizó en células HEK293T mediante la transfección de los plásmidos pLenti-EF1a-C-mGFP-P2A-Puro, pCMV-dR8.2dvpr, pCMV-VSV-G, en relación 5:5:1. Para la transfección se utilizó *Lipofectamine® 2000 Reagent* (Cat. 11668027), siguiéndose el protocolo brindado por el fabricante, finalmente confirmándose el proceso mediante microscopía de fluorescencia. El sobrenadante lentiviral fue concentrado en relación 10:1 usando *Lenti-X Concentrator* (Cat. 632165). Para la titulación de las partículas lentivirales, el día 0 se sembraron 100,000 células HEK239T por pozo dentro de una placa de 12 pozos. El día 1 se procedió a la infección de dichas células usando 1ml de medio DMEM, polibrene (8µg/ml), más el sobrenadante lentiviral con distintos factores de dilución (5, 50, 100 y 200), cambiándose el medio de cultivo por medio completo el día 2. Para el día 4 se realizó la evaluación de GFP en las células transducidas mediante citometría de flujo, buscando una condición de 10-20% de células GFP+ para evaluar el título viral.

Obtención de Linfocitos T

Mediante venopunción se obtuvieron 5-10ml de sangre proveniente de donadores sanos, almacenándose temporalmente dentro de tubos Vacutainer con EDTA. A continuación, se procedió a la extracción de PBMC usando centrifugación por gradiente de densidad con ayuda del medio *Lymphoprep™* (Cat. 07801), según las indicaciones del fabricante. Tras la extracción de PBMC se aislaron los linfocitos T usando el *Pan T Cell Isolation Kit* (Cat. 130-096-535) que permitió la selección negativa de linfocitos T mediante el marcaje magnético de las células no-objetivo.

Activación de Linfocitos T

El mismo día del aislamiento de linfocitos T humanos, estos fueron activados usando el kit *MACS®GMP T Cell TransAct™* (Cat. 170-076-156) así como 20 UI/ml de IL-2 humana recombinante (Cat. 170-076-146) en un volumen total de 0.875 ml. Tras 48hrs de incubación se procedió a la transducción de los linfocitos T. Opcionalmente, previo a la transducción se generó expansión de los linfocitos cambiando el medio de cultivo cada 48hrs por medio fresco más 100 UI/ml de IL-2.

Transducción de Linfocitos T

La transducción de los linfocitos T humanos se realizó en placa de 12 pozos con 100,000 células en un volumen total de 1 ml de medio compuesto por TexMacs™, 8µg/ml de polybrene, 100UI/ml de IL-2 humana recombinante, y el volumen de sobrenadante lentiviral requerido para cada experimento. Previo a su sembrado se centrifugó cada condición en tubos Falcon de 15ml a 800g durante 1.5 hrs a 35°C. Tras 24hrs post-transducción se cambió el medio de cultivo por TexMacs™ suplementado con 100UI/ml de IL-2 humana recombinante, dejándose incubar 48hrs más antes del uso de estos CAR-Ts en otros ensayos. La expansión de los linfocitos transducidos se realizó mediante la adición de nuevo medio con IL-2 cada 48hrs hasta un máximo de 10 días post-activación. Para evaluar la eficiencia de transducción se transdujeron linfocitos T en condiciones de 0.5, 1, 2 y 4 de MOI (del inglés *Multiplicity of Infection*). Posteriormente se evaluó el porcentaje de células GFP+ mediante citometría de flujo

Citometría de Flujo

Se realizó citometría de flujo para la evaluación de GFP en los ensayos de titulación lentiviral y evaluación de la eficiencia de transducción, leyéndose 30,000 eventos para cada condición. Para ello se usó el equipo BD FACS CANTO II, así como el software FlowJo v10 para el análisis de las lecturas. La viabilidad celular en los CAR-Ts y la línea celular AGS-Luc2 se realizó usando el Zombie Violet™ Fixable Viability Kit según el protocolo descrito por el fabricante. Tras un lavado celular con PBS 1X, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído 1% para su posterior lectura.

Evaluación de citotoxicidad

La citotoxicidad de los CAR-Ts se evaluó sobre la línea celular AGS-Luc2 o HaCaT, sembrándose 10,000 células en placas de 96 pozos en el día 0, para co-cultivarse con los CAR-Ts o linfocitos T control en el día 1 en ratios E:T (del inglés *Effector : Targeted cell*) de 0.5:1, 1:1 y 4:1, en un volumen total de 0.1 ml de medio RPMI 1640 + 10% de SFB. Posterior a 48hrs se evaluó el efecto citotóxico mediante el análisis de bioluminiscencia usando el equipo PROMEGA GloMax® Microplate Luminometer. En el caso de las células AGS-Luc2 se procedió a su lisis y posterior evaluación de luminiscencia añadiendo 25µL de D-Luciferina (*Promega Beetle Luciferin Potassium salt*, Cat: E1601), dada la expresión propia de luciferasa. En el caso de la línea celular HaCaT, se realizaron 3 lavados con PBS 1x para retirar los linfocitos del co-cultivo, y se utilizó el *Promega CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay Kit*. Para ambas líneas celulares se usó la siguiente fórmula para el cálculo de lisis específica (Brakel et al., 2021):

$$\% \text{ specific lysis} = 100 * \frac{\text{spontaneous lysis RLU} - \text{test RLU}}{\text{spontaneous lysis RLU} - \text{lysis control RLU}}$$

Análisis bioinformático

Se utilizaron las plataformas *GTEXPportal* (Lonsdale et al., 2013) y *TCGA SpliceSeq* (Ryan et al., 2012) para la identificación de isoformas y expresión de exones de CD44 en tejido tumoral y sano. La expresión de genes e isoformas, así como los análisis de correlación entre estos, se realizó a través de *GEPIA2* (Tang et al., 2017).

Análisis bioestadístico

Se utilizó la prueba *t de student* múltiple para realizar la comparación entre la citotoxicidad generada por los CAR-Ts en células AGS-Luc2 o HaCaT para los distintos ratios E:T.

6. Resultados

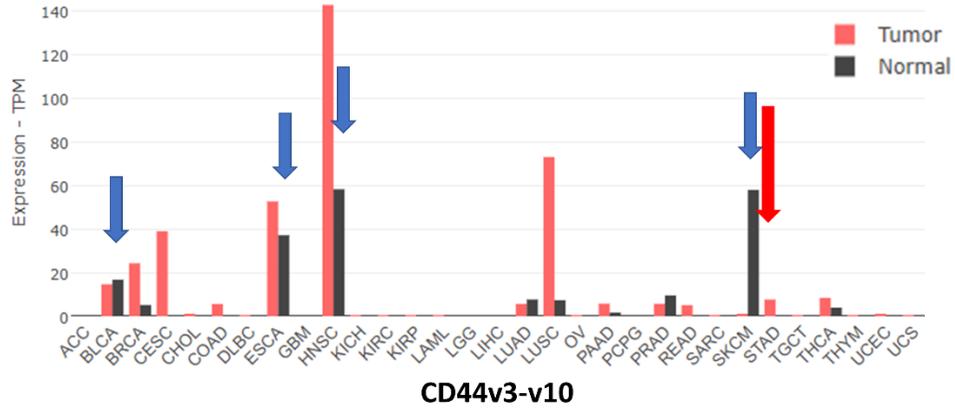
Análisis bioinformático de CD44v6

Con el objetivo de evaluar el potencial alcance de la terapia CAR-T anti-CD44v6 como tratamiento frente al CG, iniciamos identificando las principales isoformas de CD44 que podrían ser blanco del CAR-T mencionado. Para ello, analizamos dentro de las plataformas *GTEXPortal* y *TCGA SpliceSeq* la estructura de las isoformas humanas de CD44, buscando aquellas donde estuviera presente el exón v6 en conjunto con el exón 18 (transmembrana), logrando con ello la identificación de las isoformas cuya proteína pudiera anclarse a la membrana celular y a su vez ser blanco de la terapia CAR-T planteada. Dos isoformas cumplieron con ambas características, ENST00000428726.6 (hCD44v2-v10) y ENST00000415148.6 (CD44v3-v10), como se muestra en la Figura 5A. A continuación, analizamos las principales isoformas de CD44 presentes en pacientes con CG mediante la plataforma *GEPIA2*, observando que la principal isoforma expresada es CD44s, sin embargo, entre las 5 con mayor expresión también se encontró a la isoforma CD44v3-v10 (Figura 5B). La isoforma hCD44v2-v10 mostró una muy baja expresión en pacientes con CG. Lo anterior permite deducir que CD44v3-v10 podría ser la principal isoforma susceptible a la actividad de la terapia CAR-T anti-CD44v6 en el CG.

Por otra parte, observamos que la expresión de CD44v3-v10 es significativamente superior en CG comparado con tejido gástrico sano (Figura 5C). Además, la expresión de CD44v3-v10 muestra una correlación baja pero estadísticamente significativa con la expresión de HIF-1 α , GSK3- β , STAT3 y el transportador ABCC1 (Figura 5D), proteínas clave en la función y señalización asociada a CTCs. Lo anterior hace posible sugerir que la isoforma CD44v3-v10 podría guardar relación con CTCs y por lo tanto permitir su identificación.

Para evaluar la posible especificidad de nuestro CAR-T analizamos la expresión de las isoformas hCD44v2-v10 y CD44v3-v10 en los diversos tejidos humanos sanos y tumorales, observándose que la expresión de ambas isoformas es desdeñable en la mayor parte de los tejidos a excepción de piel, cabeza y cuello, esófago, y vejiga, donde es significativa su expresión (Figura 5E, flecha azul) aunque esta no supera los 60 TPM (Transcritos por millón); resultado que coincide con lo descrito en la literatura (Casucci et al., 2013).

E)



F)

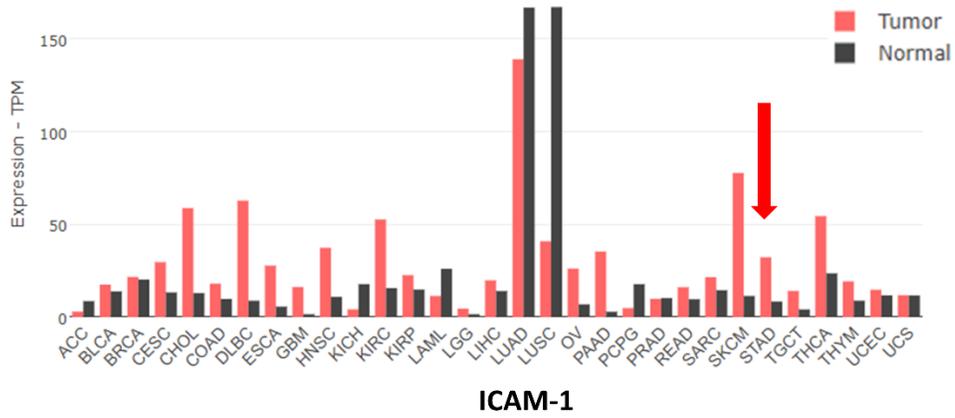
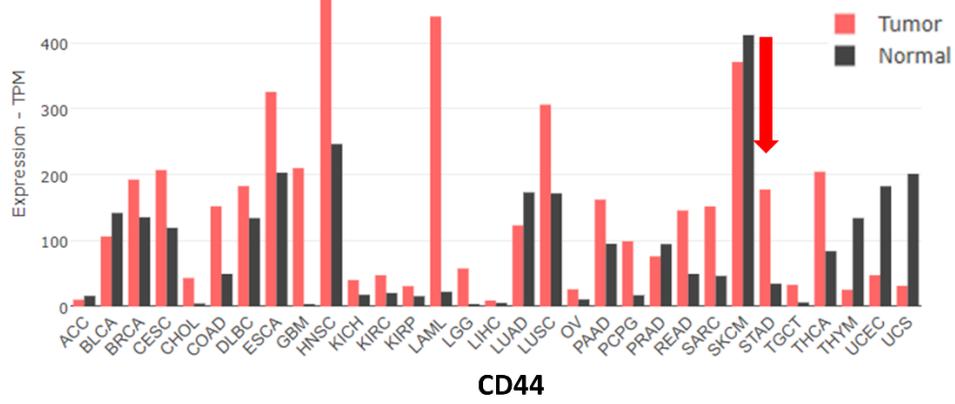


Figura 5. Análisis bioinformático sobre la expresión de CD44v6 en el CG y tejido sano. A) Identificación de isoformas de CD44 portadoras del exón v6 y transmembrana marcadas con un recuadro rojo. B) Las isoformas CD44s y CD44v3-v10 son de las principales expresadas en CG. C) Expresión de CD44v3-v10 en tejido gástrico tumoral y normal. D) Correlación entre la expresión de CD44v3-v10 y HIF-1 α , STAT3, GSK3 β y ABCC1. E) Expresión de CD44v3-v10 en tejidos sanos y tumorales. Se muestra con flechas azules los sitios de tejido normal con expresión significativa. La expresión de CD44v3-v10 se indica con una flecha roja. F) Expresión de CD44 (izquierdo) y de ICAM-1 (derecha) en los diversos tejidos tumorales y normales del cuerpo humano.

Cabe resaltar que la expresión de CD44v3-v10 en el CG (Figura 5E, flecha roja) resulta baja al compararla con otros tipos de cáncer, sin embargo, es de recordar que la presente investigación no busca un antígeno que se encuentre ampliamente expresado en el CG, sino un antígeno que permita reconocer CTCGs de manera específica, aunque esto involucre tener una baja expresión en el tumor. Por otra parte, si bien CD44v3-v10 se encuentra expresado significativamente en 4 tipos de tejido sano, esta expresión es relativamente baja. Además, al analizar la expresión de CD44 total se puede observar que es elevada en la mayoría de los tejidos (oscilando entre 0-400 TPM), e incluso al analizar marcadores como ICAM-1 (usado por otros autores como objetivo terapéutico de CAR-Ts en CG) se observa que su expresión también es significativa en la mayoría de los tejidos (sobrepasa 150 TPM en pulmón) y baja en el CG (Figura 5F). Esto deja ver que el enfoque terapéutico usando CAR-Ts anti-CD44v6 en el CG podría brindar una adecuada especificidad.

Clonación y Aislamiento del Plásmido Lentiviral

Para proceder a la síntesis del CAR-T anti-CD44v6, inicialmente se clonó el plásmido pLenti-EF1a-C-mGFP-P2A-Puro portador de la secuencia CAR (Figura 6A), para su posterior purificación mediante Miniprep y confirmación de su peso molecular mediante electroforesis. Se observa en la Figura 6B que el plásmido digerido con la enzima BamH1 coincide con el peso molecular esperado del plásmido (9,863pb). De manera interesante el plásmido no digerido migra como si presentara un menor peso molecular, probablemente debido al super-enrollamiento de este.

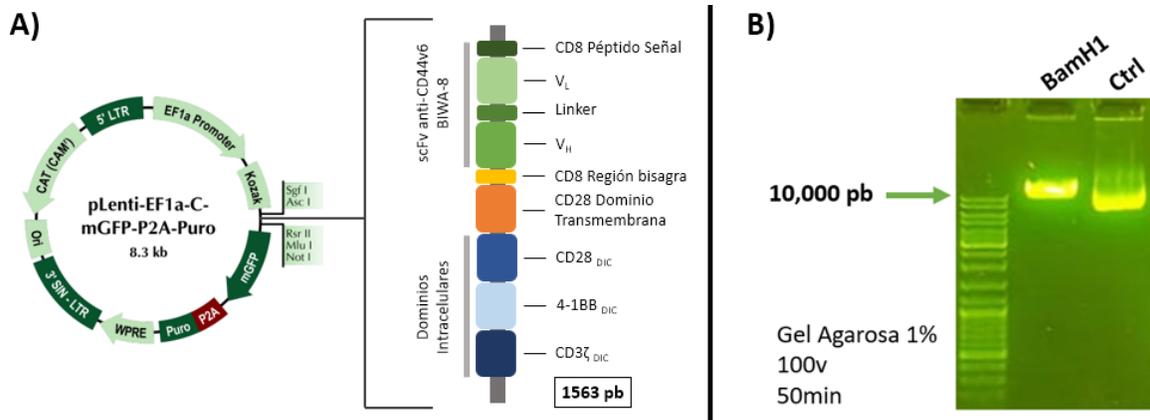


Figura 6. Estructura y clonación del plásmido lentiviral portador de la secuencia CAR. A) Estructura del plásmido lentiviral y el constructo de la secuencia CAR anti-CD44v6. B) Electroforesis del plásmido lentiviral linearizado con enzima BamH1, obtenido a partir del producto de miniprep. VL: Cadena variable ligera, VH: Cadena variable pesada, DIC: Dominio intracelular.

A continuación, se inoculó 200ml de medio líquido LB – Cloranfenicol (34µg/ml) para posteriormente purificar el plásmido mediante Maxiprep, obteniéndose 1 ml de plásmido lentiviral con concentración de 1,348.23ng/µL.

Producción y Titulación Lentiviral

Haciendo uso del plásmido pLenti-EF1a-C-mGFP-P2A-Puro y los plásmidos de empaquetamiento pCMV-dR8.2dvpr y pCMV-VSV-G, se realizó la transfección de células HEK293T para la producción lentiviral. Posterior a la incubación durante 72hrs, se usó microscopía de fluorescencia para confirmar la transfección mediante la evaluación de GFP y posterior recuperación del sobrenadante (Figura 7).

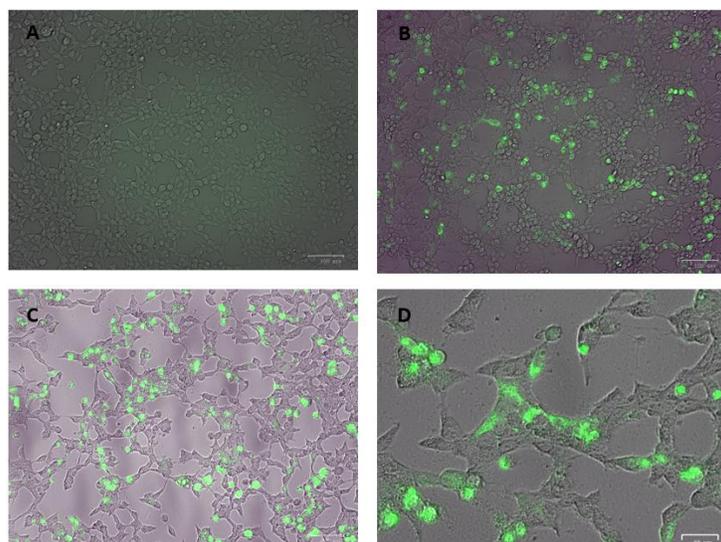


Figura 7. Microscopía de fluorescencia de células HEK293T transfectadas con plásmido lentiviral portador de secuencia para GFP. A) Células HEK293T sin transfectar; B) Células HEK293T transfectadas en zonas de alta confluencia, C) Zona de baja confluencia, D) Acercamiento a células individuales transfectadas.

Para evaluar el título viral del sobrenadante concentrado se realizó la transducción de células HEK293T con factores de dilución de 5, 50, 100 y 200. Se muestra en la Figura 8 la evaluación de GFP mediante citometría de flujo 72hrs post-infección. Tras la realización de 3 repeticiones se encontró que el factor de dilución de 5 muestra una media de 10.38% de células GFP⁺ (Figura 8F), cifra idónea para calcular el título viral (TU, del inglés *Transduction Units*) según lo reportado en la literatura (MD Anderson Cancer Center, 2022; Qu & Yang, 2021). El cálculo del UT (Unidades de Transducción) se presenta en la ecuación 1 (Hitt et al., 2000), donde N=Número de células transducidas, P=Porcentaje de células GFP⁺, V= Volumen lentiviral usado, y D=Factor de dilución.

Ecuación 1:

$$\text{Titulo} \left(\frac{UT}{ml} \right) = \frac{N * P}{V * D}$$
$$\text{Titulo} \left(\frac{UT}{ml} \right) = \frac{193,333 * 10.38}{0.2 * 5}$$
$$\text{Titulo} = 2,087,997 \frac{TU}{ml}$$

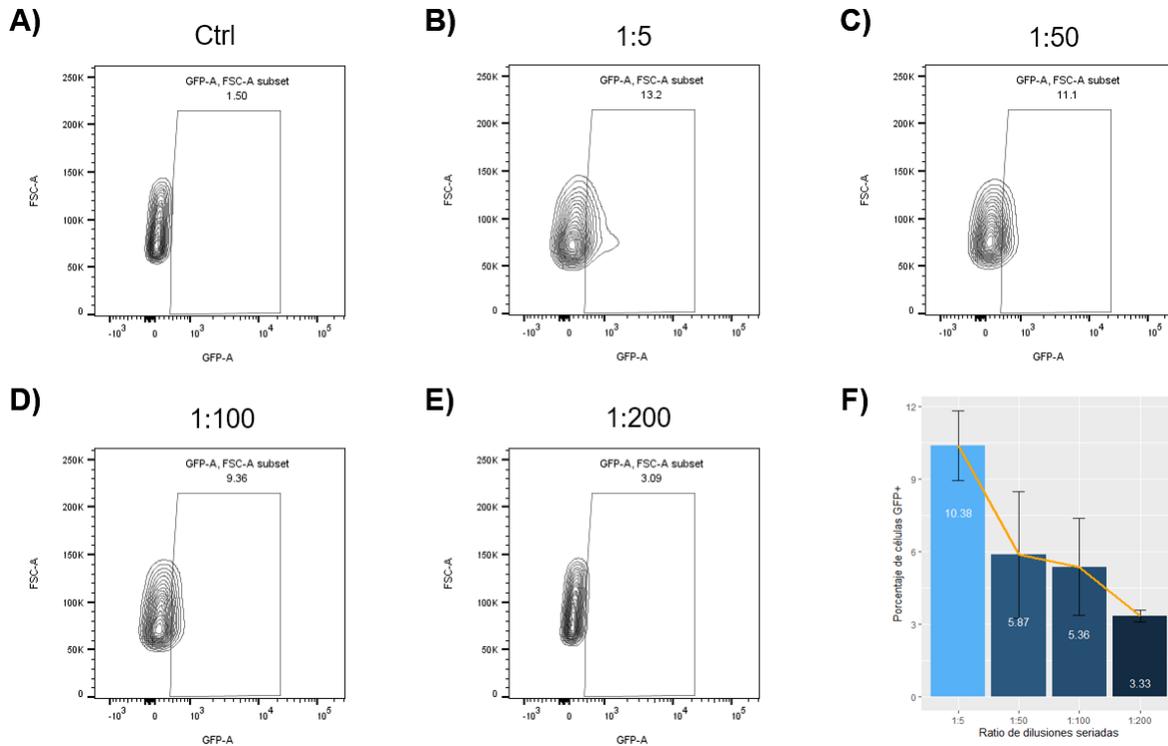


Figura 8. Citometría de flujo para la titulación viral sobre células HEK293T. A-E) Se observa un ensayo representativo para la evaluación de GFP en las distintas condiciones de transducción según la dilución del sobrenadante lentiviral. F) El gráfico muestra el porcentaje de transducción de cada condición posterior a una $n = 3$.

Eficiencia de Transducción en Linfocitos T humanos

Obtenido las UT del lentivirus vector se procedió al aislamiento y activación de linfocitos T provenientes de sangre periférica de donadores sanos, observándose en la Figura 9 que durante el segundo día post-activación se presenta una morfología celular que coincide con las características reportadas para linfocitos T activados (Xie et al., 2017).

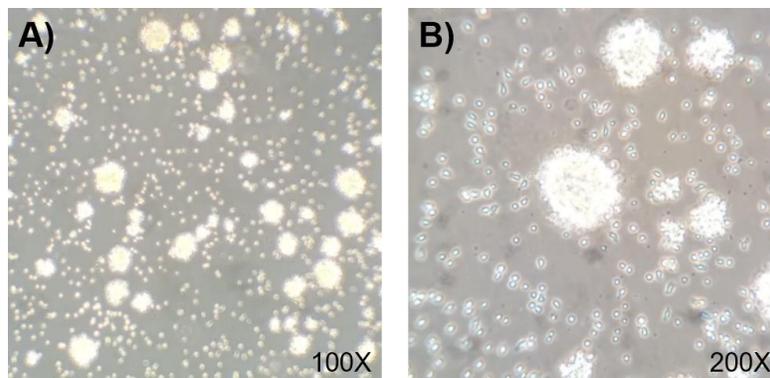


Figura 9. Micrografía de linfocitos T humanos durante el segundo día post-activación. A) Bajo un aumento de 100X, se observa la formación de agregados celulares esféricos. B) Las células individuales muestran una morfología alargada e irregular observable a mayor detalle en con un aumento de 200X.

Tras 48hrs post-activación se procedió a la transducción de los linfocitos T para la generación de CAR-Ts. La evaluación de la eficiencia de transducción se realizó usando condiciones de MOI de 0.5, 1, 2 y 4 (n=2). La Figura 10 muestra un aumento progresivo del porcentaje de linfocitos T positivos para GFP, según el aumento en el MOI, observándose (Figura 10F) que la mayor eficiencia de transducción se genera con un MOI = 2, condición que genera una media de 15.98% células T portadoras de la secuencia CAR.

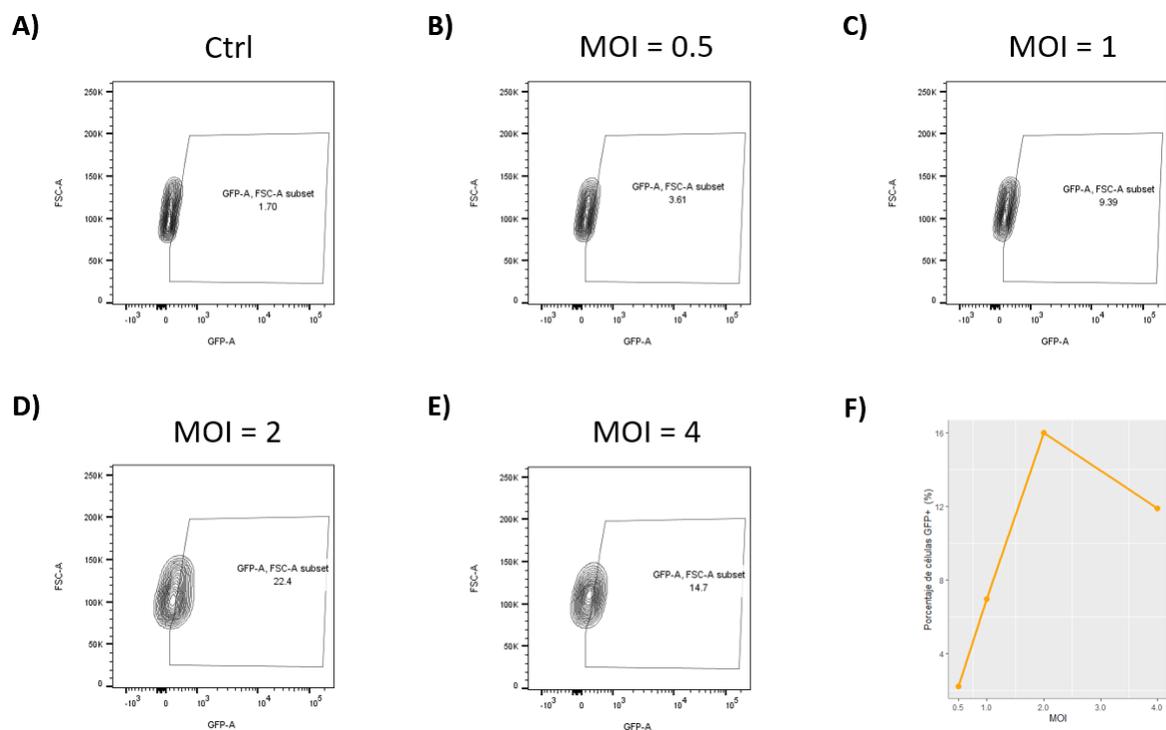


Figura 10. Eficiencia de transducción en linfocitos T humanos. A-E) Análisis de citometría representativo que muestra el porcentaje de linfocitos T GFP+ según el MOI utilizado. F) Gráfico de líneas y puntos donde se observa que el máximo de células GFP+ se obtiene con un MOI = 2.

Evaluación del efecto citotóxico de los CAR-Ts sobre cultivos celulares de cáncer gástrico

Una vez transducidos los linfocitos, se procedió a su amplificación mediante cultivo en medio TexMacs suplementado con IL-2 durante 7 días post-transducción. Previo a la evaluación del efecto citotóxico de los CAR-Ts, se procedió a determinar la viabilidad celular de estos linfocitos, con la intención de verificar un adecuado estado de la terapia. Tras realizar ensayos de viabilidad celular

usando Zombie Violet, las citometrías mostraron una media de 84.5 % de células viables dentro de los cultivos transducidos (Figura 11A y D), así como 97.35 % en los linfocitos control sin transducir (Figura 11B y D). Además, seleccionando únicamente las células GFP+ en los cultivos transducidos se pudo observar que estas mantienen un 81.55 % de viabilidad (Figura 11C y D). Esto comprueba que los CAR-Ts anti-CD44v6 que fueron generados tienen una viabilidad celular suficiente para su uso en pruebas *in vitro* y clínicas.

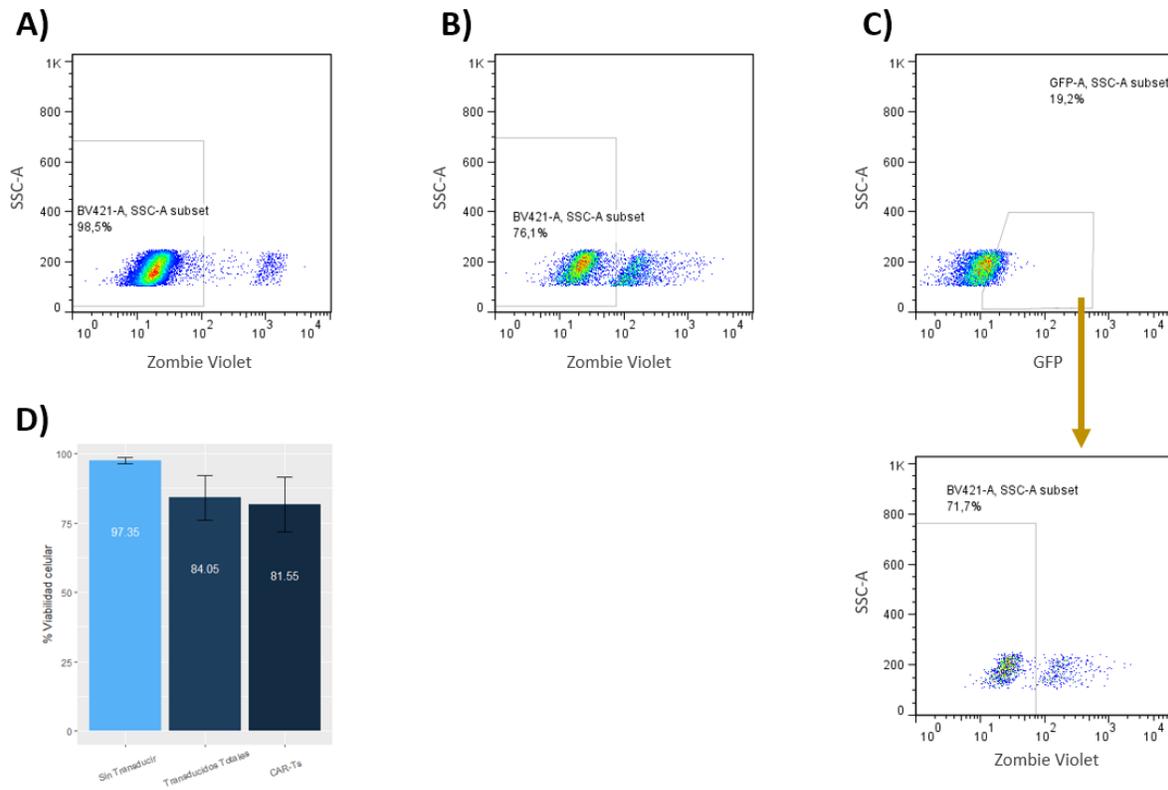


Figura 11. Evaluación de viabilidad celular en CAR-Ts y linfocitos control. Citometría de flujo con evaluación de viabilidad celular mediante Zombie Violet en A) linfocitos T sin transducir, B) linfocitos T transducidos totales, C) CAR-Ts y D) Gráfico comparativo entre el promedio de la viabilidad celular de las poblaciones de linfocitos T evaluadas (n=3).

En el día 7 post-transducción se realizaron co-cultivos entre células AGS-Luc2 y los CAR-Ts o linfocitos control durante 48 horas. Para este ensayo se utilizaron relaciones E:T de 0.5:1, 2:1, y 4:1. La citotoxicidad evaluada por luminiscencia muestra un patrón dosis-respuesta (Figura 12E) que incluso es posible apreciar por microscopía. Usando un E:T de 0.5:1 se observó una citotoxicidad media de 60.16 %, con disminución discreta del área cubierta por células AGS-Luc2 en monocapa (Figura 12B). Con relaciones E:T de 2:1 se obtuvo una citotoxicidad media de 85.55 %, percibiéndose al microscopio muy pocas células tumorales que en su mayoría muestran una morfología anormal (Figura 12C). Finalmente, con la relación 4:1 se obtuvo una citotoxicidad media de 95.4 %, con una

eliminación de células tumorales fácilmente observable por microscopía (Figura 12D). Por otra parte, la citotoxicidad inespecífica generada por los linfocitos T sin transducir fue de 5.13%, 9.8% y 11.56%, respectivamente para las relaciones E:T de 0.5:1, 2:1 y 4:1 (Figura 12E).

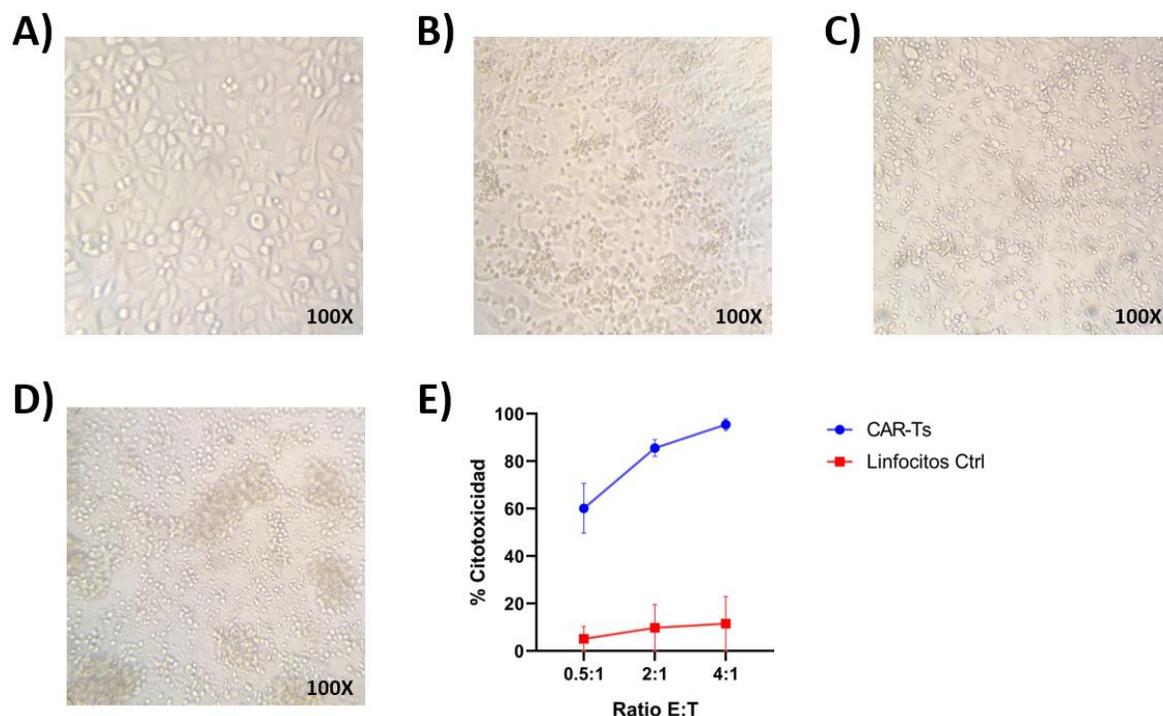


Figura 12. Efecto citotóxico de los CAR-Ts anti-CD44v6 sobre células AGS-Luc2 a 48 horas. A) Control de células AGS-Luc2 sin CAR-Ts o linfocitos control. B) Co-cultivo con E:T de 0.5:1. C) E:T de 2:1. D) E:T de 4:1. E) Gráfico del porcentaje de citotoxicidad generada por los CAR-Ts y los linfocitos T sin transducir a las distintas relaciones E:T (n=3).

Evaluación de la citotoxicidad de los CAR-Ts sobre cultivos de células HaCaT

Tras confirmar la actividad citotóxica de los CAR-Ts sobre células AGS, se buscó evaluar la especificidad de la terapia. Para ello se tomaron en cuenta los análisis bioinformáticos generados previamente (Figura 5E), donde se estableció que el tejido sano con una de las mayores presencias de la isoforma CD44v3-v10 es la piel. Con esto en mente, se buscó evaluar el efecto citotóxico del CAR-T anti-CD44v6 en la línea celular HaCaT, caracterizada por células inmortalizadas de queratinocitos humanos, intentando de esta forma visualizar el efecto citotóxico máximo que podría generar este CAR-T en tejidos no-objetivo. En la Figura 13A se puede observar el porcentaje de citotoxicidad generada por los CAR-Ts y linfocitos T sin transducir, sobre células HaCaT con las relaciones E:T previamente utilizadas con la línea celular AGS. Con un E:T de 0.5:1 se observó una citotoxicidad de 9.39%, mientras que con las relaciones 2:1 y 4:1 fue de 44.75% y 67.97%, respectivamente.

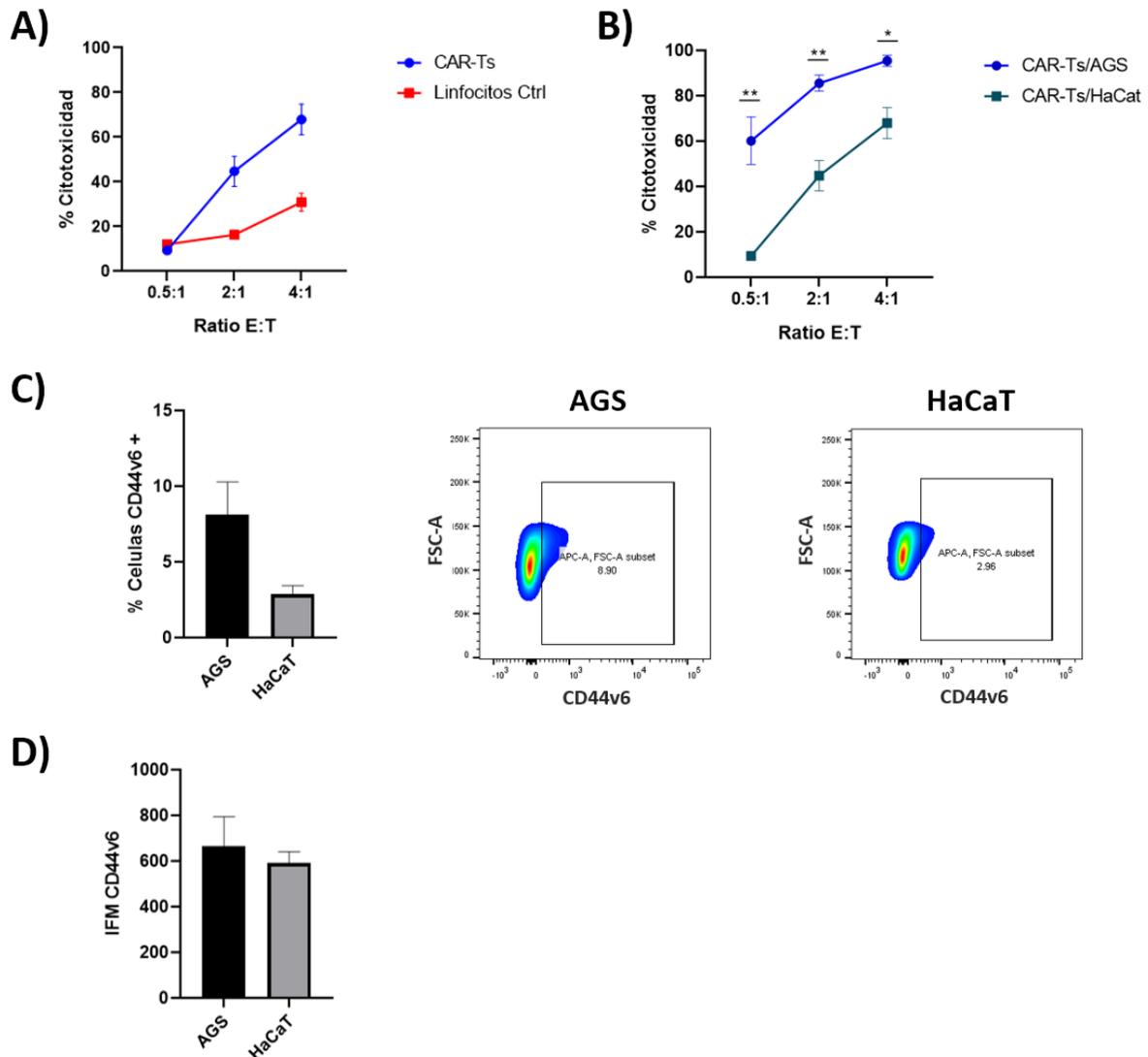


Figura 13. Efecto citotóxico de la terapia CAR-T sobre células HaCat a 48horas. A) Citotoxicidad sobre células HaCat con E:T de 0.5:1, 2:1 y 4:1 usando CAR-Ts anti-CD44v6 o linfocitos sin transducir (n=3). B) Grafico comparativo entre el efecto de la terapia CAR-T sobre células tumorales AGS y células inmortalizadas HaCat. Evaluación de CD44v6 mediante citometría de flujo en células AGS y HaCaT (n=3), mostrando: C) el porcentaje de células positivas y D) la intensidad de fluorescencia media para el marcador.

Al comparar los resultado de citotoxicidad obtenidos con células AGS y HaCat se puede observar una marcada diferencia que se acentúa al reducir la dosis, encontrándose diferencia significativa en todas las relaciones E:T (Figura 13B).

Con el objetivo de evaluar si la diferencia en el efecto citotóxico entre células AGS y HaCaT se relaciona con el nivel de CD44v6, se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia media (IFM) para este marcador en ambas líneas celulares. En células

AGS se obtuvo una media de 8.13% positivas con IFM de 663.3 unidades, mientras que en HaCaT se obtuvieron 2.85% de células positivas y 591.6 unidades de IFM (Figura 13C y D).

7. Discusión

La presente investigación parte de la intención de proponer una nueva terapia contra el CG que cumpla los requisitos de alta especificidad y eliminación de subpoblaciones tumorales clave en la progresión/quimiorresistencia tumoral. Como se mostró, la problemática inicial fue confirmar si el marcador CD44v6 se encontraba principalmente en células tumorales de CG, y no en diversos tejidos sanos. Esto nos llevó a encontrar que dentro de los datos de secuenciación genética no existe descrita como tal una isoforma de CD44 con únicamente el exón v6 como exón variante, sino que existen diversas isoformas que lo contienen, pero nunca como exón variante único. Además, las variantes CD44v3-v10 y hCD44v2-v10 son las únicas que contienen este exón v6 en conjunto con el dominio extracelular, transmembrana e intracelular, es decir, que son capaces de ser reconocidas a nivel extracelular, estar ancladas a la membrana y generar señalizaciones a nivel intracelular.

Este fue un hallazgo inesperado, debido a que en la literatura se describe a CD44v6 como una isoforma que contiene la misma estructura de CD44s pero con la presencia del exón variante v6 (Z. Wang et al., 2018). Sin embargo, no existe descrito un nombre estandarizado para la isoforma y por lo tanto es imposible buscarla en bases de datos genómicas. Pero esta discordancia con lo previamente descrito es posible, y probablemente se deriva de las metodologías utilizadas por otros autores para el análisis o evaluación de CD44v6. La mayor parte de los estudios de CD44v6 generan análisis basados en anticuerpos monoclonales (Western blot, inmunofluorescencia, citometría de flujo) y RT-PCR, técnicas que muestran simplemente la presencia o ausencia del exón v6, más no describen la presencia/ausencia de otro tipo de exones variantes en la misma isoforma (Fang et al., 2016; L. Lv et al., 2016; Pereira et al., 2020; Tempfer et al., 1996; Todaro et al., 2014; Y. Y. Xu et al., 2017). Con estos resultados bioinformáticos pudimos darnos cuenta de que nuestro CAR-T dirigido contra el exón v6 de CD44 no atacaba a una sola isoforma, sino que es capaz de atacar al menos a 2 isoformas en el cáncer gástrico.

En 2013 Casucci y colaboradores realizaron la primera evaluación del efecto anti-tumoral de CAR-Ts anti-CD44v6, evaluando su efecto sobre blastos primarios de pacientes con leucemia mieloide aguda. Usando relaciones E:T de 1:5 durante 4 días observaron un índice de eliminación de 67%, sin

embargo, al utilizar líneas celulares de mieloma (U266 y MM1.S) el índice fue menor al 20% en ambos casos. De igual manera, Casucci observó que tras el co-cultivo entre los CAR-Ts y queratinocitos primarios no se generaba actividad citotóxica a bajos E:T (menores a 1:5), sin embargo con relaciones E:T de 1:1 y 5:1 se mostró una fuerte citotoxicidad casi comparable con lo generado en células tumorales (Casucci et al., 2013).

En la presente investigación se utilizó la línea celular HaCat para evaluar el efecto de los CAR-Ts frente a queratinocitos, observándose un efecto citotóxico concentración-dependiente. Si bien lo reportado por Casucci en queratinocitos primarios parece casi el doble de la citotoxicidad descrita en esta investigación usando células HaCaT, es necesario recordar que el tiempo de co-cultivo es distinto, ya que Casucci realizó este experimento durante 4 días de co-cultivo, mientras que en esta investigación se evaluó la citotoxicidad a 48 hrs, por lo que tomando en cuenta este factor parecen coincidir los resultados. Esto sugiere que, para evitar efectos citotóxicos en células sanas los CAR-Ts anti-CD44v6 probablemente debieran utilizarse dosis bajas de la terapia, aunque esto signifique no poder eliminar toda la masa tumoral. Sin embargo, cabe recordar que este nunca fue el objetivo de la terapia, ya que se busca la eliminación de células clave en la progresión y resistencia tumoral.

De manera similar, Haist y colaboradores evaluaron el efecto de CAR-Ts dirigidos contra CD44v6 en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. Ellos observaron un efecto citotóxico distinto en cada línea celular evaluada (UT-24A, UM-11B, UM-14C), con porcentajes de lisis que van desde el 50-100% usando E:T de 3:1 durante 24hrs. Tal citotoxicidad fue directamente proporcional a la intensidad de fluorescencia media para CD44v6 en análisis por citometría de flujo (Haist et al., 2021), lo cual tiene similitud con lo reportado en este trabajo, donde la citotoxicidad en células AGS es mayor que en HaCaT aparentemente por la diferencia en el porcentaje de células positivas a CD44v6. Por otra parte, esta discusión deja al descubierto una de las limitantes para nuestra investigación: la evaluación del efecto de nuestros CAR-Ts en una sola línea celular de CG. Dado que el efecto de este tipo de CAR-Ts es dependiente de la presencia de CD44v6 en las células objetivo, se requiere probar su efecto en otras líneas celulares de CG con menor presencia del marcador e incluso en cultivos primarios de CG para tener un mejor panorama de los alcances de esta terapia en pacientes con CG.

Si bien experimentos previos han mostrado que en pacientes con CG es bajo en número de células tumorales positivas a CD44v6 (1.67%), pudiéndose esperar con ello una baja actividad anti-tumoral por parte de la terapia CAR-T propuesta, lo cierto es que recientes investigaciones con CAR-Ts anti-

CD44v6 han mostrado tener una fuerte actividad anti-tumoral en modelos *in vivo* de cáncer de ovario (Porcellini et al., 2020), que como se describe en nuestro análisis bioinformático presenta una expresión baja de CD44v6, incluso menor que en CG (Figura 5E – código OV). Esto último parece ser contradictorio con lo hasta el momento discutido, ya que al haber baja expresión de CD44v6 esperaríamos un bajo efecto anti-tumoral, sin embargo, tal discordancia también es algo que observamos en esta investigación. Nuestras evaluaciones de CD44v6 en células AGS mediante citometría de flujo nos mostraban una media de 8.13% de células positivas para este marcador, sin embargo, incluso a relaciones E:T de 0.5:1 se logró una citotoxicidad del 60.16%. Tal efecto no se observó de la misma manera en co-cultivos con células HaCaT, donde se esperaba citotoxicidad de 2.85% y se observó de 9.39%. Esto podría suponer que el efecto anti-tumoral de los CAR-Ts anti-CD44v6 es “en parte” dependiente del nivel de CD44v6 en las células tumorales, pero también debido a otros factores que impulsan un efecto anti-tumoral mayor al esperado.

En la literatura es ampliamente descrito que las CTCs modulan en microambiente celular ya sea mediante interacciones célula-célula, o bien a mediante la liberación de diversas moléculas pro-tumorales, entre las que podemos encontrar citocinas (IL-6, IL-8, IL-1 β , TGF- β), micro ARNs (miR-34a, miR-21, miR-155), factores de crecimiento (VEGF, FGF, PDGF), y activadores de vías de señalización pro-tumorales (SHH, HIF1) (López de Andrés et al., 2020). Tales interacciones pueden afectar a células del sistema inmune, pero también a células tumorales no-troncales (Mateo et al., 2014; Suzuki et al., 2022). De esta manera, es posible que la eliminación de una población de CTCs CD44v6+ podría estar regulando a la baja señales pro-tumorales, provocando con ello dificultades en la supervivencia y proliferación de células tumorales no-troncales que ya de por sí se encuentran frente a un microambiente hostil generado por los CAR-Ts.

Por otra parte, dentro de las limitantes que muestra esta investigación se encuentra la baja eficiencia de transducción que se obtuvo en linfocitos T primarios. Mientras que nuestra metodología mostro una eficiencia de transducción de 15.98%, otros autores reportan eficiencias de transducción mayores al 40% (Casucci et al., 2013; Jung et al., 2020). Ante ello, nos vimos en la necesidad de utilizar una alta cantidad de linfocitos T (transducidos y sin transducir) para alcanzar las relaciones E:T requeridas. Tal situación explica la relativamente alta citotoxicidad inespecífica generada por linfocitos T sin transducir, que regularmente se reporta como menor a 20% (Casucci et al., 2013), y que en el presente trabajo llegó a ser de 30.94% en co-cultivos con células HaCaT.

Esto nos deja con la necesidad de optimizar la metodología para la generación de CAR-Ts en futuras fases de la presente investigación.

Sin embargo, a pesar de las limitaciones mencionadas y las diversas áreas de oportunidad, esta investigación brinda pruebas para sustentar la evaluación *in vivo* de este CAR-T anti-CD44v6. Además, derivado de su especificidad (y con ello su baja probabilidad de efectos adversos severos), podría contemplarse su uso combinado/secuencial con otra terapia sistémica, con el objetivo de complementar la actividad anti-tumoral. Esta idea de terapia combinada o secuencial se sustenta además mediante el modelo de células troncales, donde al eliminar CTCGs usando la terapia CAR-T permanecen células no-troncales que pueden ser fácilmente eliminadas con terapias clásicas.

Finalmente, esta investigación brinda avances tecnológicos en el desarrollo de CAR-Ts en México, una terapia cuya síntesis requiere considerables recursos y conocimientos, que actualmente son casi inexistentes en el país.

8. Conclusiones

En conclusión, en esta investigación se demostró que CD44v3-v10 es la principal isoforma que presenta el exón v6 y un dominio transmembrana, encontrándose en pacientes con CG pero no en la mayoría de los tejidos no tumorales, por lo que tal especificidad lo hace un buen objetivo terapéutico para terapias CAR-T.

Por otra parte, con la metodología aquí descrita fue posible la generación de CAR-Ts anti-CD44v6 funcionales y con adecuada viabilidad celular, aunque se requiere optimizar el proceso de transducción para lograr una mejor eficiencia. Durante experimentos *in vitro*, esta terapia logró un fuerte efecto anti-neoplásico sobre células de cáncer gástrico, con bajos efectos citotóxicos sobre queratinocitos inmortalizados. Los resultados aquí presentados permiten contemplar una siguiente fase de estudio en modelos *in vivo* para evaluaciones de efectividad y efectos adversos, en pro de proponer una nueva opción terapéutica para el CG.

9. Referencias Bibliográficas

Alzubi, J., Lock, D., Rhiel, M., Schmitz, S., Wild, S., Mussolino, C., Hildenbeutel, M., Brandes, C., Rositzka, J., Lennartz, S., Haas, S. A., Chmielewski, K. O., Schaser, T., Kaiser, A., Cathomen, T., & Cornu, T. I. (2021). Automated generation of gene-edited CAR T cells at clinical scale.

Molecular Therapy. Methods & Clinical Development, 20, 379.

<https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2020.12.008>

Atashzar, M. R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., & Zoljalali Moghaddam, S. H. (2020). Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *Journal of Cellular Physiology*, 235, 2. <https://doi.org/10.1002/jcp.29044>

Bagheri, V., Esmaili, S.-A., Gholamin, M., & Abbaszadegan, M. R. (2022). *Rapid Isolation of Gastric Adenocarcinoma Cancer Stem Cells as a Target for Autologous Dendritic Cell-Based Immunotherapy*. *Iran Journal of Biothechnology*, 20(2): e3045
<https://doi.org/10.30498/ijb.2021.284841.3045>

Bertaux-Skeirik, N., Feng, R., Schumacher, M. A., Li, J., Mahe, M. M., Engevik, A. C., Javier, J. E., Peek, R. M., Ottemann, K., Orian-Rousseau, V., Boivin, G. P., Helmrath, M. A., & Zavros, Y. (2015). CD44 plays a functional role in Helicobacter pylori-induced epithelial cell proliferation. *PLoS Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004663>

Bie, Q., Zhang, B., Sun, C., Ji, X., Barnie, P. A., Qi, C., Peng, J., Zhang, D., Zheng, D., Su, Z., Wang, S., & Xu, H. (2017). IL-17B activated mesenchymal stem cells enhance proliferation and migration of gastric cancer cells. *Oncotarget*, 8(12), 18914–18923.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14835>

Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J., & Terzis, A. J. A. (2005). The origin of the cancer stem cell: Current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer*, 5, 11.
<https://doi.org/10.1038/nrc1740>

Brakel, B. A., Chokshi, C. R., Salim, S. K., Venugopal, C., & Singh, S. (2021). In vitro evaluation of CAR-T cells in patient-derived glioblastoma models. *STAR Protocols*, 2, 100920.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100920>

Brungs, D., Aghmesheh, M., Vine, K. L., Becker, T. M., Carolan, M. G., & Ranson, M. (2016). Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications. *Journal of Gastroenterology*, 51, 4. <https://doi.org/10.1007/s00535-015-1125-5>

Calvet, C. Y., André, F. M., & Mir, L. M. (2014). The Culture of Cancer Cell Lines as Tumorspheres Does Not Systematically Result in Cancer Stem Cell Enrichment. *PLOS ONE*, 9(2), e89644.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0089644>

- Casucci, M., Di Robilant, B. N., Falcone, L., Camisa, B., Norelli, M., Genovese, P., Gentner, B., Gullotta, F., Ponzoni, M., Bernardi, M., Marcatti, M., Saudemont, A., Bordignon, C., Savoldo, B., Ciceri, F., Naldini, L., Dotti, G., Bonini, C., & Bondanza, A. (2013). CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood*, *122*(20), 3461–3472. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-493361>
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology* *2018* *11*:1, *11*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S13045-018-0605-5>
- Chen, K. L., Li, D., Lu, T. X., & Chang, S. W. (2020). Structural Characterization of the CD44 Stem Region for Standard and Cancer-Associated Isoforms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS21010336>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, *13*(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/NRI3405>
- Cho, Y., Lee, H. W., Kang, H. G., Kim, H. Y., Kim, S. J., & Chun, K. H. (2015). Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget*, *6*(11), 8709. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3325>
- Chronister, W. D., Crinklaw, A., Mahajan, S., Vita, R., Koşaloğlu-Yalçın, Z., Yan, Z., Greenbaum, J. A., Jessen, L. E., Nielsen, M., Christley, S., Cowell, L. G., Sette, A., & Peters, B. (2021). TCRMatch: Predicting T-Cell Receptor Specificity Based on Sequence Similarity to Previously Characterized Receptors. *Frontiers in Immunology*, *12*, 673. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.640725/BIBTEX>
- Codd, A. S., Kanaseki, T., Torigo, T., & Tabi, Z. (2018). Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology*, *153*(3), 304–314. <https://doi.org/10.1111/imm.12866>
- Da Cunha, C. B., Oliveira, C., Wen, X., Gomes, B., Sousa, S., Suriano, G., Grellier, M., Huntsman, D. G., Carneiro, F., Granja, P. L., & Seruca, R. (2010). De novo expression of CD44 variants in sporadic and hereditary gastric cancer. *Laboratory Investigation* *2010* *90*:11, *90*(11), 1604–1614. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.155>
- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine*, *58*, 267–284.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.58.062105.204854>

Desai, A., Yan, Y., & Gerson, S. L. (2019). Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(1), 75.

<https://doi.org/10.1002/SCTM.18-0123>

Fang, M., Wu, J., Lai, X., Ai, H., Tao, Y., Zhu, B., & Huang, L. (2016). CD44 and CD44v6 are Correlated with Gastric Cancer Progression and Poor Patient Prognosis: Evidence from 42 Studies. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(3–4), 567–578.

<https://doi.org/10.1159/000452570>

Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C., & Fraietta, J. A. (2019). An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American Journal of Hematology*, 94(S1), S3–S9. <https://doi.org/10.1002/AJH.25418>

Fesnak, A., & O'Doherty, U. (2017). Clinical development and manufacture of chimeric antigen receptor T cells and the role of leukapheresis. *European Oncology and Haematology*, 13(1), 28–34. <https://doi.org/10.17925/EOH.2017.13.01.28>

Fischer, J. W. (2021). CAR-T Cell Therapy: Mechanism, Management, and Mitigation of Inflammatory Toxicities. *Frontiers in Immunology*, 12, 2423.

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.693016/BIBTEX>

Franco, S. S., Szczesna, K., Iliou, M. S., Al-Qahtani, M., Mobasher, A., Kobolák, J., & Dinnyés, A. (2016). In vitro models of cancer stem cells and clinical applications. *BMC Cancer* 2016 16:2, 16(2), 23–49. <https://doi.org/10.1186/S12885-016-2774-3>

Glimcher, L. H., Townsend, M. J., Sullivan, B. M., & Lord, G. M. (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 900–911. <https://doi.org/10.1038/NRI1490>

Grigor, E. J. M., Fergusson, D., Kekre, N., Montroy, J., Atkins, H., Seftel, M. D., Daugaard, M., Presseau, J., Thavorn, K., Hutton, B., Holt, R. A., & Lalu, M. M. (2019). Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, 33(2), 98–110.

<https://doi.org/10.1016/J.TMRV.2019.01.005>

Grosser, R., Cherkassky, L., Chintala, N., & Adusumilli, P. S. (2019). Combination Immunotherapy

- with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors. *Cancer Cell*, 36(5), 471–482. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2019.09.006>
- Guo, Q., Yang, C., & Gao, F. (2021). The state of CD44 activation in cancer progression and therapeutic targeting. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/FEBS.16179>
- Haist, C., Schulte, E., Bartels, N., Bister, A., Poschinski, Z., Ibach, T. C., Geipel, K., Wiek, C., Wagenmann, M., Monzel, C., Scheckenbach, K., & Hanenberg, H. (2021). CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncology*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105259>
- Han, J., Fujisawa, T., Husain, S. R., & Puri, R. K. (2014). Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-173/FIGURES/8>
- Hitt, D. C., Booth, J. L., Dandapani, V., Pennington, L. R., Gimble, J. M., & Metcalf, J. (2000). A flow cytometric protocol for titrating recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 14(3), 197–203. <https://doi.org/10.1385/MB:14:3:197>
- Houghton, J. M., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A. B., Carlson, J., Li, H., Cai, X., Fox, J. G., Goldenring, J. R., & Wang, T. C. (2004). Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, 306(5701), 1568–1571. <https://doi.org/10.1126/science.1099513>
- Ibson, D. H. (2021). Advances in the treatment of gastric cancer: 2020-2021. *Current Opinion in Gastroenterology*, 37(6), 615–618. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000776>
- Jiang, Y. X., Yang, S. W., Li, P. A., Luo, X., Li, Z. Y., Hao, Y. X., & Yu, P. W. (2017). The promotion of the transformation of quiescent gastric cancer stem cells by IL-17 and the underlying mechanisms. *Oncogene*, 36(9), 1256–1264. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.291>
- Jung, M., Yang, Y., McCloskey, J. E., Zaman, M., Vedvyas, Y., Zhang, X., Stefanova, D., Gray, K. D., Min, I. M., Zarnegar, R., Choi, Y. Y., Cheong, J. H., Noh, S. H., Rha, S. Y., Chung, H. C., & Jin, M. M. (2020). Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Targeting ICAM-1 in Gastric Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 18, 587–601. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2020.08.009>
- Khurana, S. S., Riehl, T. E., Moore, B. D., Fassan, M., Rugge, M., Romero-Gallo, J., Noto, J., Peek, R. M., Stenson, W. F., & Mills, J. C. (2013). The hyaluronic acid receptor CD44 coordinates

- normal and metaplastic gastric epithelial progenitor cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 16085–16097. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.445551>
- Kim, D. W., & Cho, J. Y. (2020). Recent Advances in Allogeneic CAR-T Cells. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/BIOM10020263>
- Lau, W. M., Teng, E., Chong, H. S., Lopez, K. A. P., Tay, A. Y. L., Salto-Tellez, M., Shabbir, A., So, J. B. Y., & Chan, S. L. (2014). CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Research*, 74(9), 2630–2641. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2309>
- Li, W., Zhang, X., Wu, F., Zhou, Y., Bao, Z., Li, H., Zheng, P., & Zhao, S. (2019). Gastric cancer-derived mesenchymal stromal cells trigger M2 macrophage polarization that promotes metastasis and EMT in gastric cancer. *Cell Death and Disease*, 10(12), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2131-y>
- Lindner, S. E., Johnson, S. M., Brown, C. E., & Wang, L. D. (2020). Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications. *Science Advances*, 6(21). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAZ3223>
- Lobo, S., Pereira, C., Oliveira, C., & Almeida, G. M. (2020). Skipping Exon-v6 from CD44v6-Containing Isoforms Influences Chemotherapy Response and Self-Renewal Capacity of Gastric Cancer Cells. *Cancers*, 12(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12092378>
- Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., Foster, B., Moser, M., Karasik, E., Gillard, B., Ramsey, K., Sullivan, S., Bridge, J., Magazine, H., Syron, J., ... Moore, H. F. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. In *Nature Genetics* (Vol. 45, Issue 6, pp. 580–585). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/ng.2653>
- López de Andrés, J., Griñán-Lisón, C., Jiménez, G., & Marchal, J. A. (2020). Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment. *Journal of Hematology & Oncology 2020 13:1*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00966-3>
- Lu, R., Zhao, G., Yang, Y., Jiang, Z., Cai, J., & Hu, H. (2019). Inhibition of CD133 Overcomes Cisplatin Resistance Through Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Autophagy in CD133-Positive Gastric Cancer Cells. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18.

<https://doi.org/10.1177/1533033819864311>

Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters*, 14(6), 6999–7010.

<https://doi.org/10.3892/OL.2017.7134>

Lv, L., Liu, H. G., Dong, S. Y., Yang, F., Wang, Q. X., Guo, G. L., Pan, Y. F., & Zhang, X. H. (2016). Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(7), 8811–8824.

<https://doi.org/10.1007/S13277-015-4755-6>

Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020). Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International Journal of Molecular Sciences 2020*, Vol. 21, Page 4012, 21(11), 4012.

<https://doi.org/10.3390/IJMS21114012>

Masoumi, J., Jafarzadeh, A., Abdolalizadeh, J., Khan, H., Philippe, J., Mirzaei, H., & Mirzaei, H. R. (2021). Cancer stem cell-targeted chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy: Challenges and prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(7), 1721–1739.

<https://doi.org/10.1016/J.APSB.2020.12.015>

Mateo, F., Meca-Cortés, Ó., Celià-Terrassa, T., Fernández, Y., Abasolo, I., Sánchez-Cid, L., Bermudo, R., Sagasta, A., Rodríguez-Carunchio, L., Pons, M., Cánovas, V., Marín-Aguilera, M., Mengual, L., Alcaraz, A., Schwartz, S., Mellado, B., Aguilera, K. Y., Brekken, R., Fernández, P. L., ... Thomson, T. M. (2014). SPARC mediates metastatic cooperation between CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. *Molecular Cancer*, 13(1), 1–17.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-237/FIGURES/6>

MD Anderson Cancer Center. (2022). *Virus titering protocols*.

[https://www.mdanderson.org/documents/core-facilities/Functional Genomics Core/Virus titering protocols.pdf](https://www.mdanderson.org/documents/core-facilities/Functional%20Genomics%20Core/Virus%20titering%20protocols.pdf)

Mehrabadi, A. Z., Ranjbar, R., Farzanehpour, M., Shahriary, A., Dorostkar, R., Hamidinejad, M. A., & Ghaleh, H. E. G. (2022). Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112512.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112512>

- Miletti-González, K. E., Murphy, K., Kumaran, M. N., Ravindranath, A. K., Wernyj, R. P., Kaur, S., Miles, G. D., Lim, E., Chan, R., Chekmareva, M., Heller, D. S., Foran, D., Chen, W., Reiss, M., Bandera, E. V., Scotto, K., & Rodríguez-Rodríguez, L. (2012). Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 18995–19007. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.318774>
- Mokadem, I., Dijksterhuis, W. P. M., van Putten, M., Heuthorst, L., de Vos-Geelen, J. M., Haj Mohammad, N., Nieuwenhuijzen, G. A. P., van Laarhoven, H. W. M., & Verhoeven, R. H. A. (2019). Recurrence after preoperative chemotherapy and surgery for gastric adenocarcinoma: a multicenter study. *Gastric Cancer*, 22(6), 1263–1273. <https://doi.org/10.1007/S10120-019-00956-6/TABLES/2>
- Murphy, K. M., Weaver, C. T., & Janeway, C. A. (2017). Janeway's immunobiology . In *America* (9th ed.). Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- Nam, K. S., Oh, S., Lee, K. min, Yoo, S. ah, & Shin, I. (2015). CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 27(9), 1882–1894. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2015.05.002>
- NCI. (2022). *CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer - NCI*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>
- Nguyen, P. H., Giraud, J., Chambonnier, L., Dubus, P., Wittkop, L., Belleanne, G., Collet, D., Soubeyran, I., Evrard, S., Rousseau, B., Senant-Dugot, N., Megraud, F., Mazurier, F., & Varon, C. (2017). Characterization of Biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 23(6), 1586–1597. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2157>
- Orian-Rousseau, V., Morrison, H., Matzke, A., Kastilan, T., Pace, G., Herrlich, P., & Ponta, H. (2007). Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Molecular Biology of the Cell*, 18(1), 76–83. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-08-0674>
- Pereira, C., Ferreira, D., Mendes, N., Granja, P. L., Almeida, G. M., & Oliveira, C. (2020). Expression

- of CD44v6-Containing Isoforms Influences Cisplatin Response in Gastric Cancer Cells. *Cancers* 2020, 12(4), 858. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12040858>
- Porcellini, S., Asperti, C., Corna, S., Cicoria, E., Valtolina, V., Stornaiuolo, A., Valentini, B., Bordignon, C., & Traversari, C. (2020). CAR T Cells Redirected to CD44v6 Control Tumor Growth in Lung and Ovary Adenocarcinoma Bearing Mice. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00099/FULL>
- Qu, J., & Yang, Z. (2021). Protocol to produce high-titer retrovirus for transduction of mouse bone marrow cells. *STAR Protocols*, 2(2), 100459. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100459>
- R Safa, A. (2020). Resistance to drugs and cell death in cancer stem cells (CSCs). *Journal of Translational Science*, 6(3). <https://doi.org/10.15761/JTS.1000341>
- Ren, J., Ding, L., Zhang, D., Shi, G., Xu, Q., Shen, S., Wang, Y., Wang, T., & Hou, Y. (2018). Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics*, 8(14), 3932–3948. <https://doi.org/10.7150/thno.25541>
- Rodriguez-Garcia, A., Palazon, A., Noguera-Ortega, E., Powell, D. J., & Guedan, S. (2020). CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Frontiers in Immunology*, 11, 1109. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01109/BIBTEX>
- Roy, S., Kar, M., Roy, S., Padhi, S., Kumar, A., Thakur, S., Akhter, Y., Gatto, G., & Banerjee, B. (2020). Inhibition of CD44 sensitizes cisplatin-resistance and affects Wnt/ β -catenin signaling in HNSCC cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 501–512. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.01.131>
- Ryan, M. C., Cleland, J., Kim, R. G., Wong, W. C., & Weinstein, J. N. (2012). SpliceSeq: A resource for analysis and visualization of RNA-Seq data on alternative splicing and its functional impacts. *Bioinformatics*, 28(18), 2385–2387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts452>
- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(MAR), 18. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2017.00018>
- Shtivelman, E., & Bishop, J. M. (1991). Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11), 5446–5453.

<https://doi.org/10.1128/MCB.11.11.5446-5453.1991>

- Smyth, E. C., Nilsson, M., Grabsch, H. I., van Grieken, N. C., & Lordick, F. (2020). Gastric cancer. *The Lancet*, *396*(10251), 635–648. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5)
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal* *2021* *11*:4, *11*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Suwannakul, N., Ma, N., Midorikawa, K., Oikawa, S., Kobayashi, H., He, F., Kawanishi, S., & Murata, M. (2020). CD44v9 Induces Stem Cell-Like Phenotypes in Human Cholangiocarcinoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 417. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00417/BIBTEX>
- Suzuki, E., Masaka, N., Urabe, T., Sasaki, M., & Hasumi, K. (2022). Direct cell–cell interaction regulates division of stem cells from PC-3 human prostate cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *631*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.09.004>
- Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L., & Wei, W. (2018). Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(JUN), 642. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00642/BIBTEX>
- Takahashi, T., Saikawa, Y., & Kitagawa, Y. (2013). Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment. *Cancers*, *5*(1), 48. <https://doi.org/10.3390/CANCERS5010048>
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- Tantalo, D. G. M., Oliver, A. J., Von Scheidt, B., Harrison, A. J., Mueller, S. N., Kershaw, M. H., & Slaney, C. Y. (2021). Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *9*(5), e002555.

<https://doi.org/10.1136/JITC-2021-002555>

- Tempfer, C., Lösch, A., Heinzl, H., Häusler, G., Hanzal, E., Kölbl, H., Breitenecker, G., & Kainz, C. (1996). Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7–8 in human breast cancer. *European Journal of Cancer*, *32*(11), 2023–2025. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00185-2](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00185-2)
- Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., Gulotta, G., Dieli, F., De Maria, R., & Stassi, G. (2014). CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell*, *14*(3), 342–356. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.01.009>
- Toden, S., Kunitoshi, S., Cardenas, J., Gu, J., Hutchins, E., Van Keuren-Jensen, K., Uetake, H., Toiyama, Y., & Goel, A. (2019). Cancer stem cell–associated miRNAs serve as prognostic biomarkers in colorectal cancer. *JCI Insight*, *4*(6). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.125294>
- Todoroki, K., Ogasawara, S., Akiba, J., Nakayama, M., Naito, Y., Seki, N., Kusukawa, J., & Yano, H. (2016). CD44v3+/CD24- cells possess cancer stem cell-like properties in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, *48*(1), 99–109. <https://doi.org/10.3892/IJO.2015.3261>
- Van Cutsem, E., Sagaert, X., Topal, B., Haustermans, K., & Prenen, H. (2016). Gastric cancer. In *The Lancet* (Vol. 388, Issue 10060, pp. 2654–2664). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30354-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30354-3)
- Vormittag, P., Gunn, R., Ghorashian, S., & Veraitch, F. S. (2018). A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current Opinion in Biotechnology*, *53*, 164–181. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2018.01.025>
- Wakamatsu, Y., Sakamoto, N., Oo, H. Z., Naito, Y., Uraoka, N., Anami, K., Sentani, K., Oue, N., & Yasui, W. (2012). Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathology International*, *62*(2), 112–119. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1827.2011.02760.X>
- Wang, X., & Rivière, I. (2016). Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, *3*, 16015. <https://doi.org/10.1038/MTO.2016.15>
- Wang, Z., Zhao, K., Hackert, T., & Zöller, M. (2018). CD44/CD44v6 a reliable companion in cancer-

initiating cell maintenance and tumor progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(AUG), 97. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2018.00097/BIBTEX>

Whilding, L. M., Halim, L., Draper, B., Parente-Pereira, A. C., Zabinski, T., Davies, D. M., & Maher, J. (2019). CAR T-Cells Targeting the Integrin $\alpha\beta6$ and Co-Expressing the Chemokine Receptor CXCR2 Demonstrate Enhanced Homing and Efficacy against Several Solid Malignancies. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 674, 11(5), 674. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11050674>

Xie, Y., Wang, M., Dong, Z., Song, H., Li, L., Yang, M., Li, P., Tian, J., Zhang, K., Xia, X., Zhang, T., & Tang, A. (2017). In vitro effects of Staphylococcus aureus enterotoxin C3 on T cell activation, proliferation and cytokine production. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 4744–4750. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7199>

Xin, T., Cheng, L., Zhou, C., Zhao, Y., Hu, Z., & Wu, X. (2022). In-Vivo Induced CAR-T Cell for the Potential Breakthrough to Overcome the Barriers of Current CAR-T Cell Therapy. *Frontiers in Oncology*, 12, 42. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.809754/BIBTEX>

Xu, H., Niu, M., Yuan, X., Wu, K., & Liu, A. (2020). CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. *Experimental Hematology & Oncology* 2020 9:1, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40164-020-00192-0>

Xu, Y. Y., Guo, M., Yang, L. Q., Zhou, F., Yu, C., Wang, A., Pang, T. H., Wu, H. Y., Zou, X. P., Zhang, W. J., Wang, L., Xu, G. F., & Huang, Q. (2017). Regulation of CD44v6 expression in gastric carcinoma by the IL-6/STAT3 signaling pathway and its clinical significance. *Oncotarget*, 8(28), 45848. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17435>

Yan, B., Mu, Y., Cui, M., & Liu, L. (2020). Clinicopathological significance and prognostic implication of CD44 and its splice variants (v3 and v6) in colorectal cancer. *Translational Cancer Research*, 9(2), 1215–1224. <https://doi.org/10.21037/TCR.2020.02.12>

Yan, Y., Li, Z., Kong, X., Jia, Z., Zuo, X., Gagea, M., Huang, S., Wei, D., & Xie, K. (2016). KLF4-Mediated Suppression of CD44 Signaling Negatively Impacts Pancreatic Cancer Stemness and Metastasis. *Cancer Research*, 76(8), 2419–2431. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1691>

Yanamoto, S., Yamada, S. I., Takahashi, H., Naruse, T., Matsushita, Y., Ikeda, H., Shiraishi, T., Seki, S., Fujita, S., Ikeda, T., Asahina, I., & Umeda, M. (2014). Expression of the cancer stem cell

- markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: Effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence. *International Journal of Oncology*, *44*(4), 1153–1162.
<https://doi.org/10.3892/IJO.2014.2289/HTML>
- Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., & Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2020 5:1*, *5*(1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>
- Yang, Y., McCloskey, J. E., Yang, H., Puc, J., Alcaina, Y., Vedvyas, Y., Gomez Gallegos, A. A., Ortiz-Sánchez, E., de Stanchina, E., Min, I. M., von Hofe, E., & Jin, M. M. (2021). Bispecific CAR T cells against EpCAM and inducible ICAM-1 overcome antigen heterogeneity and generate superior anti-tumor responses. *Cancer Immunology Research*, *9*(10), 1158.
<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-21-0062>
- Yasui, M., Kunita, A., Numakura, S., Uozaki, H., Ushiku, T., & Fukayama, M. (2020). Cancer stem cells in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Cancer Science*, *cas.14435*.
<https://doi.org/10.1111/cas.14435>
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & Development*, *13*(1), 35–48. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.1.35>
- Yu, W. L., & Hua, Z. C. (2019). Chimeric Antigen Receptor T-cell (CAR T) therapy for hematologic and solid malignancies: Efficacy and safety-A systematic review with meta-Analysis. *Cancers*, *11*, 1. <https://doi.org/10.3390/cancers11010047>
- Zhang, H., Brown, R. L., Wei, Y., Zhao, P., Liu, S., Liu, X., Deng, Y., Hu, X., Zhang, J., Gao, X. D., Kang, Y., Mercurio, A. M., Goel, H. L., & Cheng, C. (2019). CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state. *Genes and Development*, *33*(3–4), 166–179.
<https://doi.org/10.1101/GAD.319889.118/-/DC1>
- Zhang, W., Gu, J., Chen, J., Zhang, P., Ji, R., Qian, H., Xu, W., & Zhang, X. (2017). Interaction with neutrophils promotes gastric cancer cell migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Reports*, *38*(5), 2959–2966.
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5942>
- Zhang, X., Hua, R., Wang, X., Huang, M., Gan, L., Wu, Z., Zhang, J., Wang, H., Cheng, Y., Li, J., & Guo,

W. (2016). Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer. *Oncotarget*, 7(9), 9815–9831.

<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6890>

Zhou, H. M., Zhang, J. G., Zhang, X., & Li, Q. (2021). Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00430-1>