

CONSENSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR SOBRE CÉLULAS GENETICAMENTE MODIFICADAS



Artigo de Revisão: Terapia Celular em Tumores Sólidos

Mirella Nardo^a, Tatiane C. Motta^b, Leandro M. Colli^b, Mauro P. Avanzi^c

^a contribuíram igualmente para a publicação

^aDepartamento de Desenvolvimento de Novas Drogas, Oncologia Clínica; MD Anderson Cancer Center; Houston, EUA

^bDivisão de Oncologia Clínica; Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^cNeogene Therapeutics, Santa Monica, USA

PALAVRAS-CHAVES

Imunoterapia
Células CAR-T
Terapia celular
Terapia celular adotiva
Inibidores de checkpoints

RESUMO

O uso de imunoterapia no tratamento do câncer na última década trouxe importantes avanços com maior sobrevida ao paciente oncológico, especialmente com o uso dos inibidores de checkpoint. Todavia, apenas uma fração dos tumores sólidos apresentam resposta a essa modalidade de imunoterapia. Um outro braço da imunoterapia é o emprego de células como modalidade terapêutica adotiva. Essas compreendem modalidades distintas de terapias celulares, tais as células CAR T (do inglês, célula T com receptor de antígeno quimérico), os TILs (do inglês, linfócitos do infiltrado tumoral) e as células TCR T. Esses tratamentos foram eficazes em tumores hematológicos e poderão impactar nos tumores não atendidos pelos inibidores de checkpoints. Essa revisão tem como objetivo trazer os fundamentos, funcionamento, aplicabilidade clínica e resultados da terapia celular adotiva no tratamento de pacientes portadores de tumores sólidos.

Correspondência: Neogene Therapeutics, Santa Monica, USA
E-mail: mauro.avanzi@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da imunoterapia no tratamento do câncer apresentou um avanço significativo nos últimos anos, em diferentes estratégias terapêuticas, sendo as principais: estimulação inespecífica do sistema imunológico, imunização ativa usando vacinas contra o câncer e imunoterapia de transferência de células adotivas. Modalidades distintas de terapias celulares têm sido utilizadas em estudos clínicos para o tratamento de tumores sólidos, dentre eles os principais são as células CAR T (do inglês, célula T com receptor de antígeno quimérico), os TILs (do inglês, linfócitos do infiltrado tumoral) e as células TCR T (Figura 1). Outras modalidades como os NK-CARs, gama-delta

linfócitos peri-tumorais através da amostra de tumor do paciente, que é ressecada, fragmentada e cultivada em interleucina-2 (IL-2). Os linfócitos crescem, destroem os tumores e em 2 a 3 semanas geram culturas puras de linfócitos que podem ser testadas quanto à reatividade. Essas culturas são expandidas até que se obtenha número adequado para infusão dos linfócitos no paciente. Antes da realização da infusão dos linfócitos, o paciente deverá receber quimioterapia citotóxica, com o objetivo de linfodepleção, sendo assim o paciente deve preencher alguns pré-requisitos, como tolerar a quimioterapia, apresentar lesões tumorais que possam ser ressecadas e situação clínica que permita aguardar entre 4 e 6 semanas para o crescimento das células in vitro. Essa estratégia foi testada principalmente em pacientes com melanoma maligno metastático, onde obteve

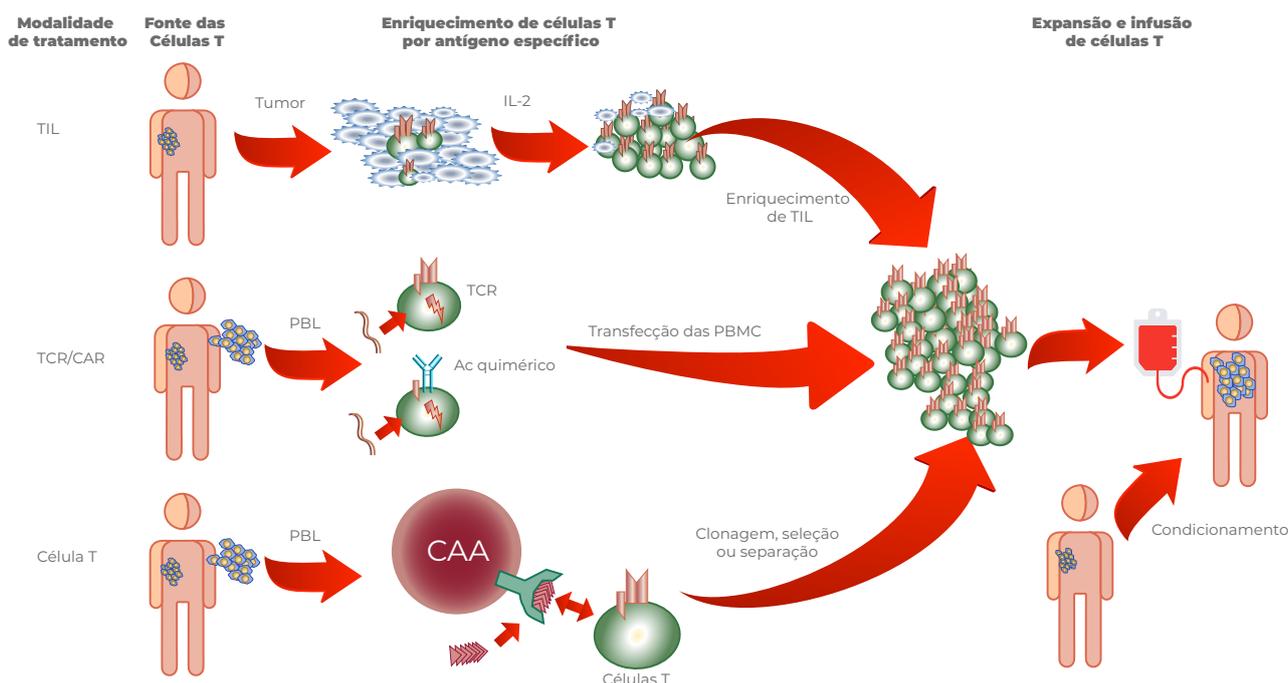


Figura 1. Princípios básicos da terapia celular adotiva, IL-2.interleucina-2, TIL sigla em inglês Tumor-infiltration lymphocytes, CAR sigla em inglês Chimeric antigen receptors, TCR sigla em inglês T-cell receptor, CAA Célula apresentadora de antígeno, PBL sigla em inglês peripheral lymphocytes, Ac anticorpo.

T cells e células T contra neoantígenos também estão sendo investigadas. O uso das células CAR-T anti-CD19 de segunda geração apresentaram resultados excepcionais em estudos clínicos contra tumores hematológicos, o que levou à aprovação do tratamento contra linfomas não Hodgkin (LNH) e leucemia linfóide aguda (LLA-B) tanto nos EUA quanto Europa. Todavia, o mesmo sucesso não tem sido observado para o tratamento de tumores sólidos. Diante dessa limitação, novas tecnologias e gerações de CAR T estão em desenvolvimento para transpassar essas barreiras e permitir que terapias celulares eficazes sejam opções terapêuticas contra tumores sólidos. Apesar de muitos estudos em andamento utilizarem diversas estratégias e tecnologias, poucos estudos até esse momento apresentaram resultados clínicos significativos. A terapia celular é uma modalidade inovadora, com grande potencial em tumores sólidos, mas ainda necessita comprovar sua eficácia em tumores sólidos (1-4).

Linfócitos do infiltrado tumoral (TILs)

O tratamento com transferência de células adotivas obtém os

resultados clínicos expressivos (19). Estudos utilizando TILs em outras indicações estão atualmente em andamento (5).

A primeira terapia com células adotivas utilizada com êxito em tumores sólidos foi a infusão de TILs em pacientes com melanoma metastático (6). Como o melanoma maligno é um dos tumores sólidos mais imunogênicos, ele tem sido um protótipo para investigações de imunoterapia ativa contra o câncer (7,8). Os pioneiros no uso de linfócitos do infiltrado, em 1988, demonstraram que TIL podem induzir a regressão do câncer quando administrado em pacientes com melanoma metastático (9). Uma análise de 86 pacientes com melanoma tratados com TIL seguido por alta dose de IL-2, demonstrou uma taxa de resposta de 34%, destes cinco pacientes (6%) alcançaram resposta completa, mas apenas 2 pacientes duraram em 21 e 46 meses (10). Desde então, tem havido um esforço para melhorar esses resultados por meio de modificações na metodologia de geração e seleção de TIL e mudanças nos regimes de tratamento realizados antes do TIL.

Recentemente, o uso de TILs visando proteínas específicas, que codificam genes mutados somaticamente tem mostrado re-

gressões clínicas em pacientes com diferentes tumores sólidos metastáticos, como melanoma maligno, colorretal, vias biliares, cervical e mama. (11-19)

Rosenberg et al. relataram um caso de câncer colorretal metastático tratado com TILs, que apresentou resposta policlonal de células T CD8 + contra a mutação KRAS G12D, com regressão objetiva das metástases pulmonares. (14) Zacharakis et al. relataram o caso de uma paciente com câncer de mama receptor de hormônio positivo, refratário, que foi tratada com TILs reativos contra versões mutantes de quatro proteínas (SLC3A2, KIAA0368, CADPS2 e CTSS), associado a interleucina IL-2, apresentando regressão completa sustentada do câncer de mama metastático. (17) Estudo fase II mostrou eficácia da TIL no tratamento de tumores metastáticos relacionados ao papilomavírus humano (HPV) com resposta objetiva em 28% na coorte de câncer cervical e 18% na coorte não cervical (câncer de canal anal e câncer orofaríngeo). (18)

Provavelmente o estudo mais expressivo sobre esse tratamento em tumores sólidos foi o estudo de fase 2, multicêntrico, de braço único, que avaliou o uso de Lifileucel em 66 pacientes com melanoma metastático refratário a imunoterapia e terapia-alvo (se BRAF mutado). A resposta objetiva global foi de 36%, sendo que dois pacientes apresentaram resposta completa, e a taxa de controle de doença foi de 80%. Além disso, o perfil de toxicidade se mostrou seguro para aqueles pacientes que não eram candidatos a inibidores de checkpoint imunológico por causa de eventos adversos prévios (19).

O advento da terapia TILs poderá fornecer uma opção de tratamento para os pacientes com melanoma metastático refratário aos tratamentos anteriores e possivelmente, em particular aqueles pacientes com neoplasias de células epiteliais que apresentam taxas de mutação mais baixas, que são menos responsivos às terapias com inibidores de checkpoint, como os tumores do trato gastrointestinal, mama e ovário. Existem ainda estudos de associação de TILs com técnicas de imagem para avaliar os efeitos da quimioterapia neoadjuvante, em experimentos com PET-TIL no tratamento neoadjuvante de câncer de mama (20) e estudos de avaliação de prognóstico utilizando sistemas de imagem para determinar a taxa de infiltração das células imunes e sua correlação com o prognóstico. (21)

Células CAR-T

O surgimento de métodos eficazes para a transferência de genes em células T fornece um novo meio para a criação de células T específicas contra o tumor, com a possibilidade da transferência de genes que codificam receptores de antígenos quiméricos ou genes de receptor de células T (TCR). (5,22) As células T tumor específicas podem ser geradas pela transferência de genes que codificam receptores de antígenos quiméricos (CARs). CARs consistem em um domínio de ligação ao antígeno tumoral que foi fundido a um domínio de sinalização intracelular que é capaz de ativar células T. O reconhecimento do antígeno, portanto, não é restrito ao HLA, como o TCR fisiológico, mas sim dirigido a estruturas nativas da superfície celular. A ligação do ligante ao receptor quimérico desencadeia a fosforilação na região citoplasmática da molécula, ativando a cascata de sinalização necessária para a indução de citólise, secreção e proliferação de citocinas. As propriedades de ativação de células T dos CARs dependem da sua composição. (4). Os resultados obtidos com célu-

las CAR-T nos tumores hematológicos foram de grande impacto clínico e modificaram as opções de tratamento. Os estudos com terapia celular adotiva com células CAR T direcionadas contra a glicoproteína de superfície CD19 em tumores hematopoiéticos resultaram em remissões sustentadas mesmo em pacientes com neoplasias malignas de células B recorrentes ou refratárias. (23,24) Esses resultados levaram a aprovação nos EUA e Europa de três terapias com células CAR-T direcionadas a CD19 em pacientes com linfomas não Hodgkin (LNH) e leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B).

Motivado pelos resultados em tumores hematológicos, o desenvolvimento da terapia com células CAR-T nos tumores sólidos não apresentou resultados semelhantes e enfrenta vários obstáculos, a começar pela alta complexidade molecular e clonal dos tumores sólidos, pelas características histopatológicas e suas diferentes localizações anatômicas. Existem, ainda, as limitações relacionadas ao microambiente tumoral imunossupressor, altamente hipoxêmico, inibição da função das células T, heterogeneidade de expressão de antígenos e a evasão imune do tumor por perda do antígeno. Devido a possível semelhança na expressão de antígenos em tecidos epiteliais, a toxicidade causada pela expressão relativa do alvo em tecidos normais é outra limitação a ser superada por novas metodologias. Ainda, um dos maiores desafios da aplicação em tumores sólidos é a identificação de antígenos tumorais específicos de superfície capazes de serem reconhecidos pelo CAR. Essa é uma importante limitação para a realização da terapia celular adotiva em tumores sólidos, considerando que a maioria dos antígenos tumorais de “alta prioridade” conhecidos e a maioria dos neoantígenos são proteínas intracelulares e, portanto, estão apenas sujeitas à vigilância imunológica como peptídeos de superfície celular transportados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). (3,25,26) Ainda, a grande heterogeneidade tumoral leva a um cenário de baixa probabilidade em que um alvo esteja presente em uma grande proporção de pacientes com mesmo tumor sólido.

Por isso, uma grande diferença dos resultados atuais do CAR T entre tumores sólidos e tumores hematológicos se baseia na dificuldade em encontrar um antígeno-alvo ideal, pois ao contrário dos tumores hematológicos, os tumores sólidos raramente expressam um antígeno específico do tumor. Na maioria dos tumores sólidos, é mais comum encontrar um antígeno associado ao tumor (AAT), onde esse antígeno é superexpresso nos tumores, mas também expresso em níveis baixos nos tecidos normais. Isso ocorre em muitos AATs frequentemente direcionados para tumores sólidos, como CEA, ERBB2, EGFR, GD2, mesotelina, MUC1 e PSMA. Essa falta de especificidade do antígeno tumoral aumenta o risco potencial de toxicidade, limitando o uso de AATs que mesmo sendo supreexpressos no tumor, apresentem uma expressão em tecidos normais (27).

Além disso, tumores sólidos tendem a apresentar um alto grau de heterogeneidade do antígeno, muitas vezes apresentando apenas um subconjunto de células que expressam o antígeno alvo. Mesmo quando um AAT é expresso uniformemente, existe a possibilidade de perda de antígeno ou escape de antígeno, ou mesmo a regulação negativa do antígeno, quando o antígeno alvo desaparece do tumor sobrevivente. (27-33) Os chamados CARs bicistronicos ou biespecíficos, que reconhecem dois antígenos, foram criados para abordar tanto a heterogeneidade do antígeno quanto a ameaça de perda do antígeno. (34-37)

Considerando que os tumores sólidos têm uma alta heterogeneidade, e evidência de escape de antígeno, outra estratégia que pode reforçar a eficácia da terapia com células CAR T é o conceito de propagação de epítomos, em que um epítomo diferente do antígeno originalmente direcionado torna-se o alvo das células T endógenas. Tais epítomos surgem a partir da lise tumoral de algumas células, levando à liberação desses novos antígenos específicos do tumor ou epítomos, que passam a ser apresentados pelas células apresentadoras de antígenos e alvos para TILs endógenos, gerando assim uma resposta imunológica secundária. Existe evidência dessa propagação em estudos de terapia com vacinas e CART, em tumores como melanoma maligno, câncer de pulmão e pâncreas. (38-40)

Várias estratégias tem sido estudadas com o objetivo de melhorar a eficácia de células CAR T nos tumores sólidos, seja com eliminação ativa de citocinas e quimiocinas para aumentar a atividade de células T, ou a combinação com outros tratamentos que aumentem a atividade anti-tumoral das células T, como por exemplo inibidores de checkpoint (anti-PD1). (11-14). Novas modalidades de CART de próxima geração estão em estudos com o objetivo de aumentar a capacidade anti-tumoral dessas células e torná-las mais resistentes ao microambiente tumoral. Células CAR-T que apresentem PD-1 knock-out, que secretem citocinas (por exemplo, IL-12, IL-18) ou que tenham uma porcentagem maior de células T pouco diferenciadas (Tscm, Tcm) poderiam apresentar efeitos anti-tumorais mais acentuados e ter uma chance maior de apresentarem alta eficácia (41-45).

Células TCR T

A especificidade da célula T é mediada pelo receptor do antígeno da célula T (TCR), que consiste de cadeias α e β que determinam geneticamente a especificidade do antígeno das células T de uma forma clonotípica. O heterodímero α/β reconhece peptídeos apresentados por moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que são referidos como antígenos leucocitários humanos (HLA). O reconhecimento do antígeno é, portanto, restrito pelo HLA de cada indivíduo. Uma maneira de melhorar o reconhecimento do tumor por células T autólogas é a introdução de genes de TCR pré-selecionados, lembrando que a capacidade do TCR em reconhecer uma célula tumoral é restrita pelos antígenos do HLA que são expressos pelo tumor. Dentre os métodos para a transferência de genes para as células T, os vetores retrovirais são os mais comumente usados, mas outros sistemas, incluindo sistemas adenovirais e não virais, também são utilizados

Somente cerca de 1% do total de proteínas celulares são realmente expressas na superfície celular, o que significa que um grande número de potenciais antígenos tumorais não estão disponíveis para uma célula CAR T (46). Por isso, a construção de um TCR-T que reconheça o antígeno em combinação com o MHC permite o reconhecimento de antígenos extra e intracelulares. Trabalhos recentes identificaram vários novos candidatos a antígenos associados ao tumor (AAT) que poderiam ser passíveis de terapia com células TCR-T com resultados promissores em nível pré-clínico e clínico (27).

O antígeno NY-ESO-1 tem se destacado nesse cenário. Esse é um tipo de antígeno do grupo denominado antígenos câncer-testículo (CTA), que são proteínas que tem papel na maturação imunológica, restrito a células germinativas humanas, expres-

so em células germinativas fetais testiculares, ovarianas e na placenta, com baixa expressão em células somáticas normais no adulto. Entretanto, esses antígenos podem ser reexpressos em várias doenças malignas, como no caso do NY-ESO-1, que é um CTA bem conhecido pela reexpressão em inúmeros cânceres. (47) Em 2016, Patel et al. mostraram sucesso em um estudo de mieloma in vivo com um híbrido CAR/TCR que reconhece o antígeno NY-ESO-1 no contexto de HLA-A2. (48) Os estudos em sarcomas têm se destacado, mostrando expressão homogênea de NY-ESO-1 em vários subtipos de sarcomas, com destaque para o lipossarcoma mixóide de células redondas (LSM) e o sarcoma sinovial (SS). (47,49) No estudo conduzido por Robbins et al, que tratou inicialmente 6 pacientes com SS, todos com haplótipo HLA-A*0201 e alta expressão de NY-ESO-1, quatro pacientes alcançaram resposta objetiva com duração de 5 a 18 meses(50). Diante desse resultado, foi realizada uma coorte expandida, com 12 pacientes com SS, dentre os quais 5 receberam adição de vacina de peptídeo NY-ESO-1 para aumentar a imunidade anti-tumoral. Nessa nova coorte, 7 pacientes alcançaram resposta objetiva e a taxa de resposta objetiva de NY-ESO-1 TCR em SS foi de 61%, com resposta durando de 3 a 47 meses. (51). Outro estudo para o tratamento de pacientes com sarcoma sinovial utilizou células TCR T contra o alvo MAGE-4 e também mostrou resultados iniciais significativos com 44% de resposta clínica com uma média de duração de resposta de 28 semanas (52).

Outras modalidades de terapia celular

Outra modalidade de CAR que começou a ser investigada nos tumores sólidos são os CAR NK, que correspondem à expressão do receptor quimérico em células Natural Killer, ao invés de células T. Os estudos ainda são iniciais e o único estudo clínico publicado até o momento foi um estudo fase 1/2, que avaliou CAR NK derivados de células de cordão umbilical, que expressaram anti-CD19, interleucina-15 e caspase 9, com a ajuda de vetores retrovirais, para o tratamento de pacientes portadores de tumores hematológicos CD19 positivos. Não foram observados casos de doença do enxerto versus hospedeiro, apesar da ausência de compatibilidade do HLA em 2 pacientes e compatibilidade parcial nos outros 9 pacientes. Dos 11 pacientes, 8 tiveram resposta ao tratamento, sendo que 7 obtiveram resposta completa. Esses dados iniciais, no entanto, devem ser utilizados para entender a segurança dessa técnica, mas não podemos considerar como uma evidência para a efetividade dessa modalidade de tratamento. (53) A idéia dessa investigação se baseia na perspectiva de que talvez o CAR NK possa transpor algumas barreiras do CAR T, especialmente em tumores sólidos, considerando que os NK dificilmente reconhecem células saudáveis pelo fato de apresentarem o MHC, que se liga ao receptor inibitório da NK. Dessa forma, essa técnica vem sendo estudada como uma promessa de reduzir os efeitos colaterais causados pela terapia celular em tumores sólidos, já que eles compartilham muito comumente antígenos com células de outros tecidos que não os tumorais. Além disso, outra vantagem dessa técnica pode decorrer do fato de que ela não requer sensibilização prévia e compatibilidade HLA e, dessa forma, poderia ser produzida universalmente para determinados antígenos, ficando como uma terapia celular 'off-the-shelf' (disponível na prateleira), o que permitiria um tratamento mais rápido, sem a necessidade de esperar as semanas necessária para a produção do CAR, e sem o risco de

não se obterem linfócitos suficientes na aférese em pacientes que já receberam várias terapias mieloablativas. (54) Outras modalidades também em investigação estão relacionadas a utilização de células NKT-invariante, células T Gama-Delta e células T que utilizem neoantígenos como alvos. Células NKT-invariante funcionam como células T, apresentam TCR na sua superfície porém reconhecem glicopeptídeos ao invés de moléculas MHC, podendo assim ser utilizada de forma halogênica. Devido a uma potencial vantagem em infiltração de tecidos tumorais talvez possa ser uma das alternativas para o tratamento de tumores sólidos. Porém, a baixa disponibilidade dessas células em circulação pode ser um fator limitante para sua utilização clínica (55). Células T Gama-Delta também estão presentes em pequenas quantidades em circulação porém a expressão de gama-delta TCR pode levar a uma vantagem no reconhecimento de antígenos variados e serem ativadas de forma completamente distinta das células T convencionais (56). A utilização de neoantígenos como alvo para terapias celulares é uma nova modalidade que está sendo investigada em estudos clínicos. A vantagem dessa terapia está relacionada à utilização de alvos altamente específicos do tumor, sendo um tratamento altamente personalizado e com alta especificidade. O tempo para identificação de neoantígenos e manufatura desse produto pode ainda ser uma limitação dessa terapia (57). Estudos clínicos estão em andamento para validar essas novas terapias e devemos aguardar pelos resultados para termos uma melhor ideia da melhor estratégia e ser implementada.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de terapia celulares com células CAR T tem se mostrado uma revolução no tratamento de pacientes com neoplasias hematológicas, no entanto, os dados em tumores sólidos não têm sido tão expressivos (58), provavelmente devido a causas multifatoriais, como baixa quantidade de antígenos de membrana reconhecíveis pelas células imunes, heterogeneidade antigênica tumoral, mecanismos complexos de evasão das células tumorais e microambientes tumorais imunossupressores. Por isso, várias estratégias têm sido estudadas com o objetivo de melhorar a eficácia da terapia celular adotiva nos tumores sólidos, seja explorando novos alvos, usando switches seguros, adicionando citocinas e quimiocinas para aumentar a atividade e infiltração de células T, explorando a combinação com outros tratamentos e investigando a possibilidade de usar outras células imunes como os CAR-NK, NKT-invariante e células T gama delta. (59-62)

No entanto, os resultados obtidos ainda não proporcionaram uma evidência científica sólida que nos permita introduzir essas técnicas fora do contexto de pesquisa clínica para tumores sólidos. Nesse momento, a terapia celular mais avançada e com dados mais promissores são os TILs para tratamento de pacientes com melanoma. Porém, os dados de estudos clínicos ainda não são definitivos e necessitam de aprovação das agências regulatórias para serem comercializados. Aguardamos atentamente os resultados de estudos em andamento que estão buscando obter melhores índices de segurança e eficácia através da otimização dessas técnicas e novas tecnologias.

REFERÊNCIAS

1. Van den Bulk J, Verdegaal EM, De Miranda NF. Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours. *Open Biol.* 2018;8(6):1-10. doi:10.1098/rsob.180037
2. Vamsidhar Velcheti, MD, and Kurt Schalper, MD P, OVERVIEW. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B* . 2016;35:298-308. doi:10.1016/j.uroloonc.2005.08.013
3. Zhang H, Ye ZL, Yuan ZG, Luo ZQ, Jin HJ, Qian QJ. New strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T cells. *Int J Biol Sci.* 2016;12(6):718-729. doi:10.7150/ijbs.14405
4. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. Targeting tumors with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(1):35-45. doi:10.1038/nrc971
5. Rooks, M.G and Garrett, W.S 2016. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139-148. doi:10.1038/nrclinonc.2011.116.Cell
6. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science (80-)*. 1986;233(4770):1318-1321. doi:10.1126/science.3489291
7. Gupta RK, McElrath-Garza AM, Morton DL. Role of melanoma-associated antigens. From Melanocytes to Melanoma Progress to Malig. Published online 2006:619-631. doi:10.1007/978-1-59259-994-3_35
8. Wang RF. Human tumor antigens: Implications for cancer vaccine development. *J Mol Med.* 1999;77(9):640-655. doi:10.1007/s001099900042
9. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988;319(25):1676-1680.
10. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber J, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(15):1159-1166. doi:10.1093/jnci/86.15.1159
11. Jazaeri AA, Zsiros E, Amaria RN, Andrew S. Artz, Robert P. Edwards RM. Safety and efficacy of adoptive cell transfer using autologous tumor infiltrating lymphocytes (LN-145) for treatment of recurrent, metastatic, or persistent cervical carcinoma. *J Clin Oncol.* 2019;15(Abstract 2538).
12. Lin B, Du L, Li H, Zhu X, Cui L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes: Warriors fight against tumors powerfully. *Bio-med Pharmacother.* 2020;132(August):110873. doi:10.1016/j.biopha.2020.110873
13. Tran E, Robbins PF, Lu Y-C, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(23):2255-2262. doi:10.1056/nejmoa1609279
14. Tran E, Ahmadzadeh M, Lu YC, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, et al. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science (80-)*. 2015;350(6266):1387-1390. doi:10.1126/science.aad125
15. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science.* 2014 May

9;344(6184):641-5.

16. Stevanović S, Pasetto A, Helman SR, Gartner JJ, Prickett TD, Howie, et al. Landscape of immunogenic tumor antigens in successful immunotherapy of virally induced epithelial cancer. *Science* (80-). 2017;356(6334):200-205. doi:10.1126/science.aak9510
17. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu YC, Zheng Z, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med*. 2018;24(6):724-730. doi:10.1038/s41591-018-0040-8
18. Stevanović S, Helman SR, Wunderlich JR, Langhan MM, Doran SL, Kwong ML, et al. A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers. *Clin Cancer Res*. 2019;25(5):1486-1493. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2722
19. Sarnaik AA, Hamid O, Khushalani NI. Lifileucel, a Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy, in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2021 May 12;JCO2100612. doi: 10.1200/JCO.21.00612.
20. Sasada S, Kimura Y, Emi A, Masumoto N, Kadoya T, Arihiro, et al. Tumor-infiltrating Lymphocyte Score Based on FDG PET/CT for Predicting the Effect of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2020;40(6):3395-3400. doi:10.21873/anticancer.14323
21. Keren L, Bosse M, Marquez D, Angoshtari R, Jain S, Varma S, et al. A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. *Cell*. 2018;174(6):1373-1387.e19. doi:10.1016/j.cell.2018.08.039
22. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* (80-). 2015;348(6230):62-68. doi:10.1126/science.aaa4967
23. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177). doi:10.1126/scitranslmed.3005930.CD19-targeted
24. Brudno JN, Somerville RPT, Shi V, Rose JJ, Halverson DC, Fowler DH, et al. Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1112-1121. doi:10.1200/JCO.2015.64.5929
25. Kostı P, Maher J, Arnold JN. Perspectives on chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy for solid tumors. *Front Immunol*. 2018;9(MAY). doi:10.3389/fimmu.2018.01104
26. Wing A, Fajardo CA, Posey AD, Shaw C, Da T, Young RM, et al. Improving CART-cell therapy of solid tumors with oncolytic virus-driven production of a bispecific T-cell engager. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(5):605-616. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0314
27. Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10(FEB). doi:10.3389/fimmu.2019.00128
28. Mejstříková E, Hrusak O, Borowitz MJ, Whitlock JA, Brethton B, Trippett TM, et al. CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer J*. 2017;7(12). doi:10.1038/s41408-017-0023-x
29. Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:357-362. doi:10.1016/j.csbj.2016.09.003
30. Jackson HJ, Brentjens RJ. Overcoming antigen escape with CAR T-cell therapy. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1238-1240. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1275
31. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2017 Jul 19;9(399):eaaa0984
32. Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu MF, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic expression of IL15 improves antitumor activity of IL13R 2-CAR T cells but results in antigen loss variants. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(7):571-581. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0376
33. Majzner RG, Mackall CL. Tumor antigen escape from car t-cell therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(10):1219-1226. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0442
34. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3814-3826. doi:10.1172/JCI87366
35. Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. Multi targeted CAR-T cell therapies for B-cell malignancies. *Front Oncol*. 2019;9(MAR):1-7. doi:10.3389/fonc.2019.00146
36. Wilkie S, Van Schalkwyk MCI, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJ, Pereira AC, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. 2012;32(5):1059-1070. doi:10.1007/s10875-012-9689-9
37. Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, Pignata A, Landi D, Navai AS, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3036-3052. doi:10.1172/JCI83416
38. Corbière V, Chapiro J, Stroobant V, Ma W, Lurquin C, Lethé B, et al. Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases. *Cancer Res*. 2011;71(4):1253-1262. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2693
39. Tosch C, Bastien B, Barraud L, Grellier B, Nourtier V, Gantzer M, et al. Viral based vaccine TG4010 induces broadening of specific immune response and improves outcome in advanced NSCLC. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):1-10. doi:10.1186/s40425-017-0274-x
40. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2):112-120. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0170
41. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012 May 3;119(18):4133-41. doi: 10.1182/blood-2011-12-400044.
42. Avanzi MP, Yeku O, Li X. Engineered Tumor-Targeted T Cells Mediate Enhanced Anti-Tumor Efficacy Both Directly and through Activation of the Endogenous Immune System. *Cell Rep*. 2018 May 15;23(7):2130-2141. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.051.
43. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell*. 2020 Aug; 11(8): 549-564.

45. Arcangeli S, Falcone L, Camisa B. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching T SCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Front Immunol.* 2020 Jun 19;11:1217. doi: 10.3389/fimmu.2020.01217.
46. Walseng E, Köksal H, Sektioglu IM, Fåne A, Skorstad G, Kvalheim G, et al. A TCR-based Chimeric Antigen Receptor. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-10. doi:10.1038/s41598-017-11126-y
47. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, Hendrickx W, Dermime S, Bedognetti D, et al. NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: Current perspectives. *Front Immunol.* 2018;9(MAY). doi:10.3389/fimmu.2018.00947
48. Krina Patel, MD, Simon Olivares, BS, Harjeet Singh, PhD, Lenka V. Hurton, PhD, Mary Helen Huls, BS, Muzaffar H. Qazilbash, MD, Partow Kebriaei, MD, Richard E. Champlin, MD, Laurence J.N. Cooper MP. Combination Immunotherapy with NY-ESO-1-Specific CAR+ T Cells with T-Cell Vaccine Improves Anti-Myeloma Effect. *Blood.* 2016;128(22):3366.
49. Endo M, de Graaff MA, Ingram DR, Lim S, Lev DC, Briare-de Bruijn IH, et al. NY-ESO-1 (CTAG1B) expression in mesenchymal tumors. *Mod Pathol.* 2015;28(4):587-595. doi:10.1038/modpathol.2014.155
50. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29(7):917-924. doi:10.1200/JCO.2010.32.2537
51. Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: Long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):1019-1027. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2708
52. Van Tine BA, Butler MO, Araujo D. ADP-A2M4 (MAGE-A4) in patients with Synovial Sarcoma. *Annals of Oncology* (2019) 30 (suppl_5): v683-v709. 10.1093/annonc/mdz283
53. Liu E, Marin D, Banerjee P. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 2020;382:545-53. DOI: 10.1056/NEJMoa1910607
54. Shah NN & Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 372–385 (2019).
55. Webb TJ, Yuan W, Meyer E. NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.*, 23 June 2020 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01314>.
56. Kabelitz D, Serrano R, Kouakanou L. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell Mol Immunol.* 2020 Sep;17(9):925-939. doi: 10.1038/s41423-020-0504-x.
57. Wang Y, Bhave MS, Yagita H. Natural Killer T-Cell Agonist α -Galactosylceramide and PD-1 Blockade Synergize to Reduce Tumor Development in a Preclinical Model of Colon Cancer. *Front Immunol.* 2020; 11: 581301. Published online 2020 Oct 20. doi: 10.3389/fimmu.2020.581301
58. Presti V Lo, Buitenwerf F, van Til NP, Nierkens S. Gene augmentation and editing to improve tcr engineered t cell therapy against solid tumors. *Vaccines.* 2020;8(4):1-22. doi:10.3390/vaccines8040733
59. Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, et al. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther.* 2017 Sep 6;25(9):2214-2224 et al. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther.* 2017;25(9):2214-2224. doi:10.1016/j.ymthe.2017.05.012
60. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, Marson A. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep.* 2017 Apr 7;7(1):737.
61. Hegde UP, Mukherji B. Current status of chimeric antigen receptor engineered T cell-based and immune checkpoint blockade-based cancer immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(9):1113-1121. doi:10.1007/s00262-017-2007-x
62. Maus M V., Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood.* 2014;123(17):2625-2635. doi:10.1182/blood-2013-11-492231

Este artigo está em processo de publicação na revista Hematology, Transfusion and Cell Therapy.