



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Eje de Fisiología
Laboratorio de Fisiología celular**

TERAPIA ONCOLÓGICA CON RECEPTOR QUIMÉRICO DE ANTÍGENOS

**Tesis para obtener el título de
Licenciatura en Biomedicina**

Presenta:

Alicia Esmeralda Islas Montiel

Directora de tesis:

D.C. Maura Cárdenas García

Puebla, Pue. marzo 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por rodearme de personas que siempre creyeron en mí, dedico este trabajo a toda mi familia y especialmente a mis padres, porque ellos son el motor de todos mis esfuerzos y sueños, a mi novio René por impulsarme a ser mejor siempre.

Gracias a mis profesores por compartir conmigo su pasión por la ciencia y por su apoyo incondicional, porque cada uno dejó una huella de conocimiento en mi vida.

ÍNDICE

1. Glosario	3
2. Resumen	4
3. Introducción	6
3.1 Definición de Cáncer	8
3.2 Contexto Histórico y Social	9
3.3 Inmunología del cáncer	11
3.3.1 Inmunidad Innata	12
3.3.1.1 Células supresoras derivadas de mieloides (MDSC)	13
3.3.1.2 Células Dendríticas	14
3.3.1.3 Células Asesinas Naturales (NK)	14
3.3.2 Inmunidad Adaptativa	15
3.3.2.1 Linfocitos B	16
3.3.2.2 Linfocitos T	17
3.4 Terapias convencionales	19
3.4.1 Quimioterapia	22
3.4.2 Radioterapia	23
4. Justificación	24
5. Objetivo General	25
6. Objetivos Particulares	26
7. Método	26
8. Desarrollo	30
8.1 Medicina Personalizada	30
8.1.1 Terapia con transferencia de células adaptadas	32
8.2 Terapia CART	33
8.2.1 Clasificación y estructura de Receptores de antígenos quiméricos	34
8.2.2 Desarrollo de antígenos quiméricos	39
8.2.3 Aislamiento y enriquecimiento de Linfocitos T	42
8.2.4 Activación de células T	43
8.2.5 Sistema de transferencia de genes por transducción viral	44
8.2.5.1 Vectores Virales	47
8.2.5.1.1 Vectores lentivirales	47
8.2.5.1.2 Vectores retrovirales	51
8.2.5.1.2.1 Vectores Alfa retrovirales	51
8.2.5.1.2.2 Vectores Gamma retrovirales	52
8.2.5.1.3 Vectores Adenovirales	52
8.2.6 Edición del genoma	53
8.2.7 Expansión de células T	54
8.2.8 Criopreservación	56
8.5.6 CARTS aprobados por la FDA y la Ema	56
9. Conclusiones y Perspectivas	61
10. Bibliografía	64

1. GLOSARIO

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AICD: muerte celular inducida por activación
- APC: célula presentadora de antígeno
- CAR: Receptor de antígeno quimérico
- CARTS: linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos
- CD: células dendríticas
- CLASIFICACIÓN TNM: datos sobre la carga tumoral (T), la presencia de células cancerosas en los ganglios linfáticos regionales y de drenaje (N) y la evidencia de metástasis (M).
- COX: ciclooxigenasa
- ENT: enfermedades no transmisibles
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- GM-CS : factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos
- GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos
- IDH: Índice de Desarrollo Humano.
- IFN- γ : interferón gamma
- IFN: interferones
- IFN-1: interferones de tipo I
- LLA: leucemia linfoblástica aguda
- LTR: promotores retrovirales en las repeticiones terminales largas
- MDSC: las células supresoras derivadas de mieloides
- MHC I y II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- M-MDSC supresoras derivadas de polimorfonucleares monocitos y macrófagos
- NK: células del Sistema inmune innato, asesinas naturales
- PBMC: células mononucleares de sangre periférica
- Pdc: células dendríticas plasmocitoides
- PG: prostaglandinas
- PMN-MDSC: células supresoras derivadas de polimorfonucleares mieloides
- ScFv: cadena simple de fragmento variable
- SLC el síndrome de liberación de citoquinas
- STAT-3: factor activador de la transcripción 3
- TAPA-1: proteína de membrana de tetraspanina CD81
- Treg: célula T reguladoras
- VSV-G: pseudotipificación con proteína g del virus de la estomatitis vesicular
- Gy: gray es una unidad derivada de la dosis de radiación ionizante
- ALL: leucemia linfocítica aguda
- DLBCL: linfoma difuso de células B grandes
- GALV: leucemia del mono gibón
- Mab: anticuerpos monoclonales
- PBL linfocitos de sangre periférica
- VCP: vector de alto título
- LTR: repeticiones terminales largas retrovirales
- SIN: Vectores lentivirales auto inactivados

2. RESUMEN

Nuestro sistema inmunológico está especializado para detectar alteraciones en procesos biológicos a nivel celular y regular las respuestas necesarias para que los tejidos vuelvan a un estado de homeostasis. Por lo tanto, las células inmunes tienen el potencial de funcionar como estrategias terapéuticas al utilizar sus funciones y capacidades fisiológicas como un sistema especializado para interactuar y proteger al cuerpo de cualquier riesgo de enfermedad.

Durante los últimos años, el cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte a nivel mundial, por este motivo las investigaciones en medicina personalizada han abierto una gama de diferentes tipos de terapias dirigidas e inmunoterapias con virtudes muy particulares, ofreciendo una nueva alternativa de tratamiento para tipos de cáncer con resistencia a medicamentos y aparentemente incurables.

Aprovechar el sistema inmunitario para reconocer y destruir células tumorales ha sido el objetivo central de la inmunoterapia contra el cáncer, las nuevas inmunoterapias han mostrado una seguridad y respuesta comprobable en ciertos tipos de cáncer, y una de las más prometedoras, es la transferencia de células adaptadas con receptores quiméricos de antígenos (CAR), de los que actualmente existen 4 generaciones, desarrollados con éxito a partir de vectores virales recombinantes, estos receptores quiméricos están dirigidos a receptores sobre expresados en las células tumorales, y las evidencias demuestran que los pacientes tratados con esta terapia tienen regresiones completas de neoplasias avanzadas en fases agudas, la remisión puede durar desde 2-5 años dependiente de la persistencia de células T en suero, y un manejo adecuado de los efectos adversos que puede causar este tratamiento.

En este trabajo se realizó una revisión de bibliografía de manera sistemática, que incluyó artículos de investigación originales, revisión y ensayos clínicos de terapias con linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos (CAR-T por sus siglas en inglés), como una de las terapias con resultados comprobables en varios tipos de cáncer hematológico, y sintetizamos algunos de estos avances recientes sobre las terapias CAR-T aprobadas por la

Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) desarrolladas a partir de vectores virales recombinantes y aplicadas en ensayos clínicos, para observar como la transferencia de genes virales permite la integración y la expresión génica del antígeno quimérico y su efecto terapéutico duradero. Observamos los múltiples desafíos que enfrentan las células CAR-T en el tratamiento de neoplasias hematológicas por la heterogeneidad de la expresión de antígenos que combinada con dosis altas de células modificadas lleva a efectos tóxicos, como el síndrome de liberación de citocinas y el riesgo de mutagénesis de inserción causada por la integración del ADN del vector en las células huésped cerca de un oncogén potencial con todos los vectores de integración, a pesar de observarse tasas de remisión y perfiles de toxicidad similares en estos ensayos.

En este trabajo se realiza una revisión de una de las terapias que se encuentra en estudios de fase clínica que ha reportado resultados prometedores en cáncer hematológico y cómo la evolución de esta tecnología ha producido una sólida estrategia inmunoterapéutica antitumoral personalizada exitosa.

3. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico está especializado para regular y coordinar alteraciones o cambios significativos a nivel sistémico, así como las respuestas necesarias para que los tejidos vuelvan al estado de homeostasis. Por lo tanto, las células inmunes tienen el potencial de funcionar como estrategias terapéuticas al utilizar sus funciones y capacidades fisiológicas como un sistema único para interactuar y defender al cuerpo de cualquier riesgo de enfermedad. Con los rápidos avances tecnológicos, ahora se han logrado diseñar y modificar células inmunes con nuevos receptores de respuesta terapéutica controlable para identificar y tratar enfermedades como el cáncer, que logran burlar la protección inmunológica natural normalmente (Kolee, 2017).

El concepto de que el sistema inmunológico puede reconocer y controlar el crecimiento tumoral se remonta a 1893, cuando William Coley usó bacterias vivas como estimulante inmunológico para tratar el cáncer, pero el entusiasmo

por la inmunoterapia contra el cáncer ha sido moderado debido a la limitada eficacia clínica. Esta eficacia limitada se debe a la capacidad de las células tumorales para evitar el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmunológico, lo que les permite establecerse en el huésped. En las últimas décadas, se ha logrado un gran progreso en la comprensión de la evasión inmunológica de las células tumorales en contra del sistema inmunológico, lo que a su vez ofrece nuevas formas de detener estos mecanismos y evitar la diseminación de cualquier tipo de cáncer (Yang, 2015).

Nuevos enfoques terapéuticos, han revolucionado los tratamientos oncológicos y trascienden los modelos reduccionistas clásicos de estudiar tipos de células individuales o genes de forma aislada para proporcionar una visión global del complejo ecosistema celular subyacente y el paisaje transcripcional que controla la latencia. En esta perspectiva, sintetizamos algunos de estos avances recientes para describir los sellos distintivos de la latencia de las células cancerosas y cómo el ciclo de vida de las células cancerosas latentes ofrece oportunidades para atacar no solo el cáncer sino también su entorno para lograr una cura duradera para cánceres aparentemente incurables. En esta perspectiva, sintetizamos algunos de estos avances recientes para describir la funcionalidad de las terapias CAR-T sobre células cancerosas, y cómo el ciclo de vida de éstas células latentes ofrece oportunidades para atacar no solo el cáncer sino también su entorno para lograr una cura duradera para cánceres aparentemente incurable (Phan & Croucher, 2020).

La idea de que el sistema inmunológico podría limitar el desarrollo de tumores (inmunovigilancia), surgió bajo el fundamento de que el sistema inmunológico puede discriminar entre lo propio y lo ajeno, pero se ha demostrado que hace más que eso, el sistema inmunológico no sólo se puede controlar el desarrollo, sino que también puede moldear la inmunogenicidad de las células tumorales, la inmunoedición del cáncer surgió como un concepto más que integra los roles complejos de inmunidad en el cáncer. El sistema inmunológico proporciona vigilancia contra el cáncer, generando respuestas inmunes adaptativas contra antígenos tumorales (Baumeister et. al 2016).

En todas las terapias inmunológicas personalizadas, la genética y la biología molecular permiten el aprovechamiento del potencial de células propias, para redirigirlos hacia antígenos específicos, es así que nacen las terapias de células adaptadas, dentro de las cuales, destaca la modificación de linfocitos T con receptores de antígenos quiméricos, adaptados y modificados a partir de ingeniería genética para generar una respuesta inmunológica específica contra proteínas (generalmente receptores), sobre expresadas en la membrana de las células tumorales, lo que representa una enorme oportunidad de desarrollo de nuevos blancos terapéuticos a partir del mismo modelo biológico.

3.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER

El concepto de cáncer o neoplasia abarca un conjunto de enfermedades con acumulación de un número variable de alteraciones genéticas, y la pérdida de procesos reguladores celulares normales de diferente etiología. La historia natural, pronóstico y tratamiento específicos que tienen en común un crecimiento celular del organismo indiscriminado, autónomo, y con capacidad de metástasis es prácticamente específico para cada tumor (Tian et al. 2010).

El cáncer está mediado por numerosas vías moleculares y celulares. El esquema general de eventos que causan cáncer es en el que, las células primero adquieren mutaciones impulsoras en genes críticos que conducen a una expresión alterada de proteínas con diferentes actividades, que favorecen el crecimiento e impulsan colectivamente la transformación de una célula normal a una cancerosa. Debido a la señalización crónica para aumentar la proliferación y / o disminuir la apoptosis, estas células se expanden clonalmente en tumores (Patterson et al 2018). Según el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, el término cáncer es utilizado como un término para las enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos o distantes a través de los sistemas sanguíneo y linfático (NCI 2020). Según la OMS el cáncer es "un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo" (OMS 2019).

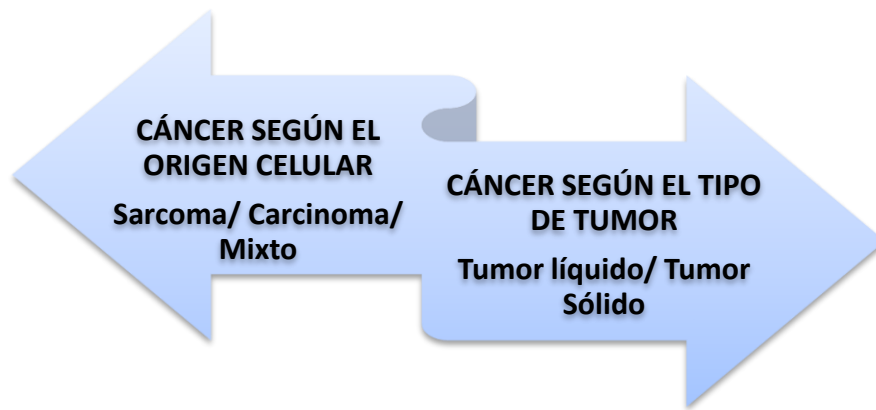


Figura 1 Clasificación de cáncer en dos grupos por su origen histológico carcinoma, sarcoma o mixtos y de acuerdo al tipo de tumor que genera la alteración celular, se pueden clasificar en tumores sólidos y líquidos. (Dias et al 2018)

La clasificación del cáncer se puede realizar de diferentes maneras, dependiendo del tejido de origen, puede ser un carcinoma al tener origen en un tejido epitelial o sarcoma si proviene de tejido conectivo, según la estirpe celular, por ejemplo, de origen linfóide o mielóide según sea el origen, y la clasificación según el estadio proporciona información de pronóstico, limitada ya que no predice la respuesta a la terapia, según sus receptores y reactividad o respuesta ante las terapias existentes.

La literatura reciente ha aludido a la importancia del sistema inmunológico del huésped para controlar la progresión del tumor y la estadificación tradicional del tumor (clasificación TNM) resume los datos sobre la carga tumoral (T), la presencia de células cancerosas en los ganglios linfáticos regionales y de drenaje (N) y la evidencia de metástasis (M). Sin embargo, ahora se reconoce que el resultado clínico puede variar significativamente entre pacientes dentro de la misma etapa. Así, la evidencia apoya la noción de incluir biomarcadores inmunológicos, implementados como una herramienta para la predicción del pronóstico y la respuesta a la terapia (Galon, 2012).

3.2 CONTEXTO HISTÓRICO Y SOCIAL

Recientemente se hizo un descubrimiento sobre el cáncer más antiguo, un osteosarcoma de un metatarsiano, en un homínido en el Sur de África, que se remonta a 1,7 millones de años que plantea origen prehistórico del cáncer y sus

determinantes genéticos. (Chene et al 2016). Así es cómo determinamos que nuestra comprensión del proceso de la evolución del tumor se deriva en gran medida de los datos recopilados en un solo punto de tiempo: el punto de tiempo al final del proceso cuando el tumor es examinado como muestra para analizarlo como muestra de patología (Graham, 2017).

El campo de la carcinogénesis ha evolucionado rápidamente, en particular desde la revolución de la biología molecular en la década de 1970 (Galon,2012) y al pasar de los años, el cáncer constituye una enorme carga para la sociedad tanto en los países económicamente desarrollados como en los menos desarrollados. La incidencia del cáncer está aumentando debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como a una prevalencia cada vez mayor de factores de riesgo establecidos como el tabaquismo, el sobrepeso, la inactividad física y los patrones reproductivos cambiantes, asociados con la urbanización y el desarrollo económico. Según las estimaciones de GLOBOCAN, han aumentado a 19,3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes por cáncer en 2020. A lo largo de los años, la carga se ha trasladado a los países menos desarrollados, que actualmente representan alrededor del 57% de los casos, y el 65% de las muertes por cáncer en todo el mundo (Torre et al 2012).

El Índice de Desarrollo Humano (IDH) es un clasificador útil para la globalización del cáncer, porque toma en cuenta la educación y la esperanza de vida, así como el ingreso nacional, y los países se clasifican en uno de los cuatro niveles de desarrollo: bajo, medio, alto y muy alto. Aunque las enfermedades transmisibles y los trastornos relacionados con la nutrición siguen siendo las causas más comunes de muerte en los países con IDH bajo, se prevé que sean superadas por las ENT, incluido el cáncer, para 2030. El aumento proyectado de la carga mundial de cáncer: de 12,7 millones de casos nuevos en 2008 a 22,2 millones en 2030 indica el crecimiento de la población y la evolución de la distribución por edades, junto con otros cambios importantes en la incidencia subyacente, asociados a la prevalencia y distribución de los factores de riesgo (Pilleron et. al 2018).

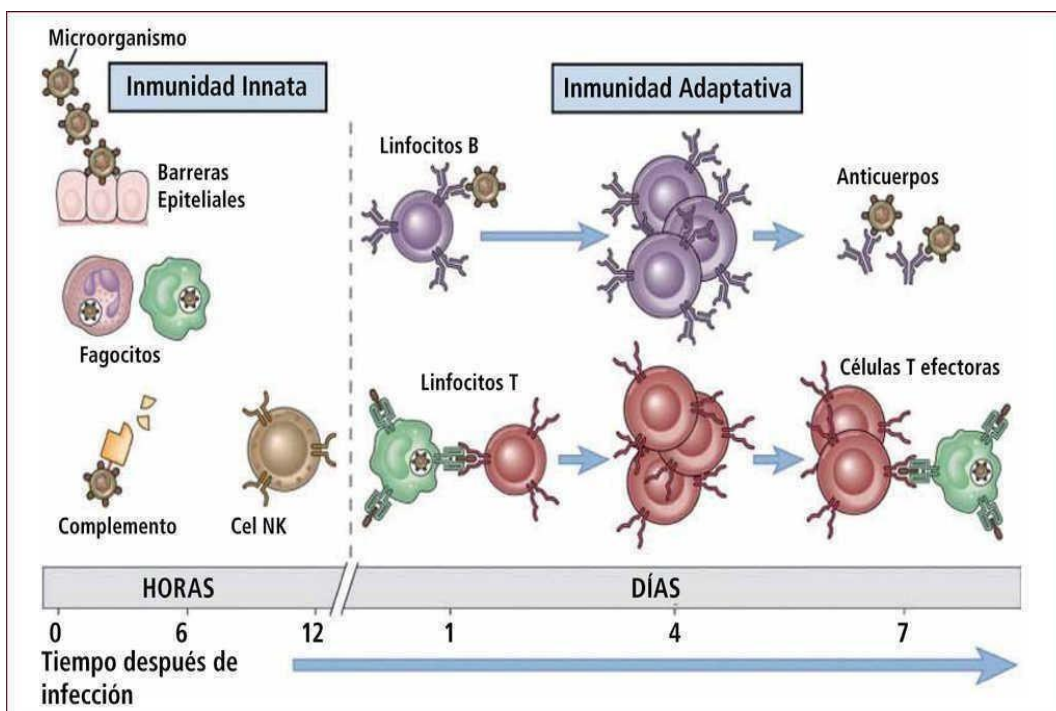
3.3 INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

La transformación de una célula normal en una cancerosa probablemente no sea un evento tan crítico en la génesis del cáncer; más bien es la incapacidad de las células inmunitarias del cuerpo para identificar y destruir las células cancerosas recién formadas cuando son pocas. El riesgo de cáncer se multiplica en aquellas personas cuyo sistema inmunológico está inhibido debido a cualquier factor, incluido: el estrés crónico, predisposición genética, radiación, enfermedades metabólicas, el uso prolongado de fármacos, exposición a virus oncogénicos, tabaco u hormonas (Raval et. al 2014). Los sistemas inmunitarios innatos y adaptativo funcionan para proteger al huésped de patógenos extraños y, en general, son tolerantes con los tejidos del huésped, diferenciando adecuadamente entre antígenos "propios" y "no propios". En el contexto de un tumor en evolución, es probable que el sistema inmunológico esté expuesto a numerosos antígenos, nunca antes vistos, que surgen de anomalías genéticas. Curiosamente, se cree que el sistema inmunológico es capaz de percibir y eliminar algunos tumores al principio de su desarrollo. Sin embargo, la teoría de la inmunoedición, que implica el proceso de inmunovigilancia, sugiere que ciertos tumores escapan de un estado de equilibrio previamente controlado por el sistema inmunológico y se vuelven clínicamente significativos (Roy, 2016).

Muchos cánceres humanos y modelos de cáncer en ratón provocan una gran alteración de la hematopoyesis, esta alteración se manifiesta de manera más prominente en una expansión de neutrófilos y monocitos inmaduros en la periferia de los hospedadores cargados de tumores y contribuyen a la inmunosupresión local (Patterson, 2018).

En resumen, la gran mayoría de la investigación que destaca las perturbaciones inmunitarias periféricas en el contexto del cáncer se ha centrado en este aumento de las poblaciones mieloides inmaduras e inmunosupresoras; sin embargo, esta expansión también suele coexistir con alteraciones de muchos otros linajes inmunes periféricos, las células madre y progenitoras hematopoyéticas se movilizan hacia la proliferación y diferenciación hacia los linajes monocíticos y granulocíticos, lo que da como resultado la expansión periférica y la acumulación intratumoral de neutrófilos inmunosupresores

inmaduros, a menudo denominados células supresoras derivadas de polimorfonucleares mieloides (PMN-MDSC) y monocitos (M-MDSC) y macrófagos (Lin et. al 2019) Para delinear la base subyacente de la evasión inmune del cáncer y diseñar inmunoterapias efectivas, es esencial comprender cómo interactúa el cáncer con el sistema inmunológico. La evidencia acumulada durante la última década a partir de modelos de ratón y pacientes humanos con cáncer ha demostrado la importancia del sistema inmunológico para reconocer y eliminar las células malignas transformadas (Yang, 2015).



Revista Médica Clínica Las Condes. 2012;23:446-57

Figura 2. Imagen modificada, mecanismo de acción de las dos tipos de inmunidad contra patógenos (Toche 2012).

3.3.1 INMUNIDAD INNATA

El sistema inmunológico innato actúa como una primera línea de defensa contra agentes extraños, responde durante un período corto de tiempo en minutos u horas, tiene una variedad de mecanismos efectores y es filogenéticamente más antiguo que la respuesta inmune adaptativa. Hay una multitud de diversos componentes de la inmunidad innata que incluyen barreras físicas (epitelio de la piel y membranas mucosas), células efectoras (macrófagos, células NK, células linfoides innatas, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos, entre

otros), mecanismos reconocimiento de patrón PRR por sus siglas en inglés, dentro de los que se encuentran receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD, RLR, superfamilia de lectinas, tipo Scavenger, pentraxinas, péptidos formilados, sensores de material genético citosólico, y mecanismos humorales como proteínas del complemento o citocinas (Karim, 2021).

Existen diferentes mecanismos inmunológicos no específicos descritos contra células tumorales, sin embargo las principales respuestas están mediadas por células fagocíticas, células asesinas naturales (NK), sistema de complemento (citocinas involucrada en reacciones inmunes), interferones (IFN) y otras citocinas; la función principal de las APC (es decir células presentadoras de antígenos como: células dendríticas, macrófagos) es capturar al antígeno y presentarlo a los linfocitos T y eliminar a la célula tumoral (Xiaodong, 2013), a continuación describimos algunos de los principales mecanismos inmunológicos innatos relacionados con la eliminación de células tumorales, y las células inmunitarias que intervienen en la respuesta antitumoral.

3.3.1.1 CÉLULAS SUPRESORAS DERIVADAS DE MIELOIDES (MDSC)

En un entorno de inflamación crónica, que precede o rodea el ambiente tumoral, la diferenciación de las células mieloides induce la expansión de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que son una población heterogénea de células inmunitarias incluidos macrófagos, neutrófilos y células dendríticas con potentes actividades inmunosupresoras.

En el cáncer, los factores que inducen la expansión de MDSC incluyen una variedad de citocinas producidas por células tumorales o células del estroma tumoral, que estimulan la mielopoyesis e inhiben la diferenciación terminal de linajes mieloides, estos factores incluyen metabolitos del ácido araquidónico (COX/PG), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de células madre o diferentes tipos de interleucinas. Al unirse a sus receptores específicos, la mayoría de estas citocinas activan las vías de señalización del transductor de señales y el activador de la transcripción 3 (STAT-3).

Esto mejora la supervivencia y proliferación celular, reduce la apoptosis y previene la diferenciación completa de progenitores mieloides en células maduras. Se encontró que el microambiente tumoral influye tanto en la diferenciación como en la función de MDSC, en este contexto, una acumulación de células mieloides inmaduras en la periferia o en los tejidos puede tomarse como un signo de alarma de una situación que impulsa su expansión puede utilizarse como marcador de las circunstancias patológicas que inducen dicho aumento en número (Serafini et al 2006).

3.3.1.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DC) son células mieloides diferenciadas terminalmente que se especializan en el procesamiento y presentación de antígenos, se diferencian en la médula ósea de varios progenitores, los monocitos son los principales precursores en los seres humanos. Existen diferentes subpoblaciones de células dendríticas, son un grupo heterogéneo de células inmunitarias innatas que se infiltran en los tumores y presentan antígenos derivados de tumores a las células T vírgenes. Las DC desempeñan un papel fundamental en la preparación de la inmunidad de las células T antitumorales. Los cDC1 de ratón son altamente eficientes en la presentación cruzada de antígenos, es decir, la presentación de antígenos extracelulares por moléculas MHC I, y por lo tanto, son fundamentales para preparar las respuestas de las células T CD8⁺ al antígeno tumoral exógeno, además las células dendríticas plasmocitoides (pDC) se reconocen como los principales productores de interferones de tipo I (IFN-I) en cáncer, el IFN-I derivado de pDC puede promover la inmunidad antitumoral a través de su actividad directa tanto en el tumor como en las células inmunitarias al secretar una variedad de otras citocinas y quimiocinas inflamatorias para reclutamiento de nuevas células presentadoras de antígenos, aunque con menor eficiencia que las DC convencionales (Wilie et. al 2019).

3.3.1.3 CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NK)

Las células conocidas como asesinas naturales se observaron por primera vez en la década de los 80's, cuando varios estudios demostraron mayor incidencia en cánceres con baja actividad de NK y se ha demostrado que las células NK pueden controlar tanto el crecimiento tumoral local como la metástasis debido a su capacidad para ejercer citotoxicidad celular directa sin sensibilización previa y para secretar citoquinas inmunoestimuladoras como IFN- γ (Levy et. Al. 2011).

En pacientes y modelos animales, células NK deterioradas o la deficiencia de células NK se ha asociado no solo con infecciones por virus recurrentes, sino también con un aumento de incidencia de varios tipos de cáncer. Las funciones de las células NK están estrechamente reguladas por un equilibrio entre la activación y señales inhibitorias a través de una multitud de receptores expresados en la superficie celular, y utilizando estos receptores, las células NK son capaces de reconocer y luego destruir espontáneamente las células alteradas, células infectadas o tumorales, sin sensibilización previa, de hecho, estas células anormales pueden iniciar el efecto citotóxico de las células NK e iniciar la producción de citocinas, al unirse al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I para desencadenar sus funciones antitumorales (Xiaodong, 2013).

3.3.2 INMUNIDAD ADAPTATIVA

En contraste con la respuesta inmune innata, la adaptativa es más específica, pero más lenta, consiste principalmente en el trabajo conjunto de células B y T, la respuesta inmune innata más rápida generalmente se caracteriza por la inflamación de los tejidos. La inflamación del tejido como parte de la respuesta inmune innata sirve para ayudar a eliminar patógenos extraños invasores, iniciar la reparación del tejido y puede servir para estimular la respuesta inmune adaptativa a través de las células B y T. Sin embargo, existe una cantidad significativa de evidencia de que tanto la inflamación aguda como la crónica pueden promover anomalías genéticas y la progresión del cáncer (Karim, 2021).

Hay alrededor de 2×10^{12} linfocitos en el cuerpo humano, lo que hace que el sistema inmunitario sea comparable en masa celular al hígado o al cerebro, la respuesta inmune adaptativa específica de antígeno, está mediada por células presentadoras de antígeno, células plasmáticas, células T citotóxicas y células B de memoria, en comparación con la respuesta inmune innata, la respuesta del sistema inmune adaptativo proporciona una defensa más específica y genera una memoria para antígenos de tumores que pueden desarrollarse a futuro (Renrick et al. 2019).

3.3.2.1 LINFOCITOS B

Las células B son conocidas principalmente por estar a cargo de la producción de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos, el descubrimiento de las células B se produjo a mediados de la década de 1960, cuando se demostró que eran responsables de la secreción de anticuerpos, y las células que requerían un timo intacto (células T), asociadas con respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado. Inicialmente, las células B se definieron como linfocitos que expresan receptores de inmunoglobulina de superficie celular clonalmente diversos capaces de reconocer antígenos específicos (Fremd, 2013).

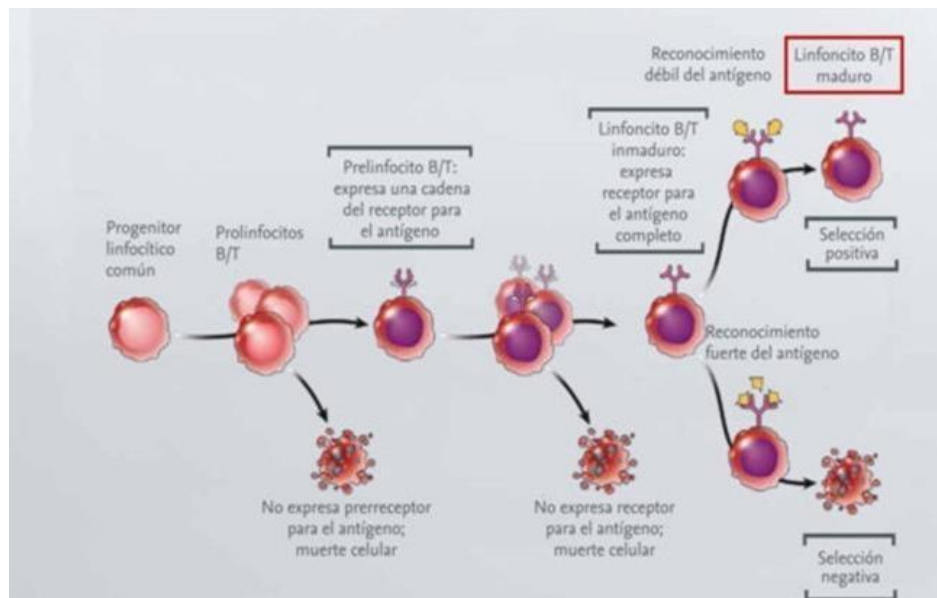


Figura 3 Diferenciación de linfocitos desde su progenitor común (Abbas 2017)

La señalización y producción de anticuerpos para células B depende de diferentes proteínas de membrana como la CD19 de naturaleza glicoproteica de 95 kd, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, CD19 se clasifica como una proteína transmembrana de tipo I, con un solo dominio transmembrana, un extremo C citoplasmático y un extremo N extracelular, es utilizado como un biomarcador de células B normales y neoplásicas, así como de células dendríticas foliculares, está involucrado de manera crítica en el establecimiento de umbrales de señalización de células B intrínsecos a través de la modulación de la señalización independiente y dependiente del receptor de células B (TBR), y funciona como el componente de señalización dominante de un complejo multimolecular en la superficie de las células B maduras, junto con el receptor de complemento CD21 y la proteína de membrana de tetraspanina CD81 (TAPA-1), así como CD225. A través del estudio de modelos de ratones transgénicos y knockout para CD19, queda claro que CD19 juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio entre la respuesta humoral inducida por antígeno y la inducción de tolerancia (Baumeister et al. 2016).

3.3.2.2 LINFOCITOS T

Los linfocitos T se originan a partir de progenitores de la médula ósea que migran al timo para su maduración, selección y posterior exportación a la periferia. Las células T periféricas comprenden diferentes subconjuntos, incluidas las células T vírgenes, que tienen la capacidad de responder a nuevos antígenos, las células T de memoria que se derivan de la activación previa de antígenos y mantienen la inmunidad a largo plazo, y las células T reguladoras (Treg) que mantienen bajo control las respuestas inmunitarias. Hay dos clases principales de células T, las citotóxicas matan a células tumorales o células infectadas, y células T colaboradoras que ayudan a activar macrófagos, células B y las células T citotóxicas. Los linfocitos T reguladoras secretan una variedad de proteínas señalizadoras denominadas citocinas, que actúan como mediadores locales y expresan una variedad de proteínas coestimuladoras en su superficie.

Los linfocitos T citotóxicos efectores matan a las células diana infectadas también por medio de proteínas que secretan o exhiben en su superficie y pueden migrar a sitios distantes, pero allí actúan solo localmente sobre las células vecinas (Rangel-Sosa 2017).

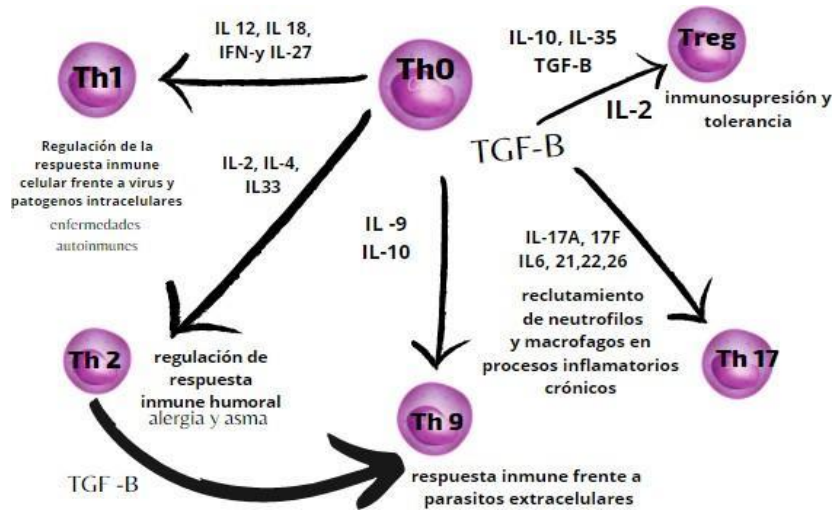


Figura 4. Descripción de subtipos de linfocitos T y sus respuestas inmunológicas (He et al 2020)

Los antígenos expresados en tumores que están presentes en tejido sano, pero sobreexpresados en cáncer, proporcionan una ventaja de crecimiento a la célula y existe evidencia de que existen poblaciones de células T específicas del tumor, tanto en la circulación como en el microambiente tumoral, sin embargo, la mera presencia de estas células parece insuficiente para permitir la regresión del cáncer, una explicación probable es que estas poblaciones poseen la menor capacidad de proliferación sostenida y son las más propensas a la senescencia y la apoptosis, en resumen, son incapaces de expandirse a la magnitud requerida para inducir una regresión tumoral clínicamente aparente y esta situación se agrava en muchos pacientes por el uso rutinario de quimioterapia citotóxicos y radioterapia que sirve para reducir los subconjuntos de células T menos diferenciadas (Galluza, 2014).

En la respuesta adaptativa, los antígenos asociados a tumores en las células presentadoras de antígenos son presentados por las moléculas del MHC clase I y II, a los receptores específicos de las células T CD8 + y CD4 + respectivamente

para su activación, pero los linfocitos T CD8+ se consideran las principales células efectoras antitumorales, una vez activados, median la lisis de las células tumorales, y las células T CD4+, las Th1 son responsables de la inmunidad celular: secretan interleucina (IL)-2, TNF α e interferón- γ (IFN- γ), promueven la actividad citotóxica de los macrófagos e inducen la sobreexpresión de MHC I y III en la APC. Por el contrario, las células Th2 expresan IL-4, mejorando la inmunidad humoral y regulando la actividad de los macrófagos (Perica et al. 2015).

3.4 TERAPIAS CONVENCIONALES

En los últimos años se han producido grandes avances y generación de conocimientos sobre los mecanismos moleculares y celulares que median la carcinogénesis. Aunque el cáncer ha existido durante más de un millón de años en la especie humana, no se han logrado desarrollar terapias efectivas para la mayoría de los cánceres que se dirigen a vías moleculares y celulares. Se han examinado múltiples dianas celulares para prevenir o tratar cánceres que incluyen, entre otros, factores de transcripción, vías de señalización celular mediadas por quinasas y, más recientemente como la inmunomodulación con células T modificadas el cual se profundizará más adelante. Incluso a medida que aumenta el conocimiento de los mecanismos del cáncer, existe un margen considerable para mejorar la prevención y el tratamiento de los cánceres. Por lo tanto, si bien ha aumentado el desarrollo de regímenes de tratamiento y prevención, existen ciertos obstáculos que deben superarse para aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer a través de la inmunoterapia personalizada.

El tratamiento del cáncer a menudo tiene como objetivo lograr reducciones rápidas, grandes y sostenidas de la carga tumoral. Incluso cuando se logran estas fuertes respuestas, el tratamiento falla con frecuencia debido a la aparición de nuevas estirpes de células especialmente resistentes a los fármacos (Hansen, 2020).

La cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia hormonal son cuatro modalidades tradicionales para el tratamiento del cáncer. Muchos agentes

quimioterapéuticos citotóxicos tradicionales tienen un índice terapéutico (NTI) muy estrecho, una tasa de respuesta general baja, una toxicidad sistémica rápida y grave, una eficacia impredecible y una resistencia frecuente. Existe una necesidad urgente de terapias más específicas, menos tóxicas y más individualizadas para mejorar la eficacia y seguridad de los tratamientos contra el cáncer. Es particularmente crítico para los cánceres difíciles de tratar que son refractarios a la quimioterapia o la terapia hormonal y son especialmente agresivos y resistentes (Patterson, 2013).

El cáncer comprende una desconcertante variedad de enfermedades que matan a 7,5 millones de personas cada año, los diferentes fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. La respuesta obtenida se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación del tumor. En general, a mayor proliferación se prevé una mayor respuesta al tratamiento citostático. En la evolución del cáncer se van produciendo nuevas alteraciones genéticas que provocan una heterogeneidad celular y, por tanto, unas propiedades bioquímicas, un tiempo de duplicación y una respuesta al tratamiento antitumoral diferentes, y estos mecanismos están estrechamente ligados a la aparición de resistencias farmacológicas (Benedí et al 2006).

Han pasado setenta años desde el primer uso informado de la quimioterapia contra el cáncer, las neoplasias malignas y actualmente son la segunda causa más común de muerte entre niños y adultos (Gilbertson, 2011), el término "quimioterapia" fue acuñado por un químico alemán Paul Ehrlich que investigó el uso de medicamentos para tratar enfermedades infecciosas, también fue el primer científico en estudiar modelos animales para detectar una serie de sustancias químicas con respecto a su actividad potencial contra enfermedades y se ha documentado que el uso de arsenicales se inició en los años 1900. La radioterapia y la cirugía fueron los pilares del tratamiento del cáncer en la década de 1960, y a medida que se hicieron evidentes las micrometástasis y la recurrencia del cáncer después de la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia combinada comenzó a ser más utilizada (Flores et al. 2020).

El tratamiento del cáncer a menudo tiene como objetivo lograr reducciones rápidas, grandes y sostenidas de la carga tumoral. Incluso cuando se logran estas fuertes respuestas, el tratamiento falla con frecuencia debido a la aparición de nuevas estirpes de células especialmente resistentes a los fármacos (Hansen et al. 2020).

La quimioterapia o la radioterapia son tratamientos convencionales contra el cáncer y su fundamento está basado en la inducción de varias modalidades de muerte de células tumorales que liberan antígenos derivados del tumor, así como señales de peligro que podrían capturarse para desencadenar una respuesta inmune antitumoral o ignorarse. La evidencia demuestra que ciertos agentes quimioterapéuticos y la radiación ionizante podría conferir a las células tumorales capacidades inmunogénicas, reclutando citocinas, células dendríticas, células presentadoras de antígeno y células T CD4 y CD8 reactivas a tumores, tanto en modelos animales como en pacientes, por todo lo anterior es que el sistema inmunológico resulta un blanco de estudio para tratamiento de cáncer (Ma et al. 2011). La acción de los tratamientos de radio-quimioterapia conlleva una serie de efectos secundarios porque estos tratamientos no sólo van a ejercer su efecto sobre las células tumorales sino también sobre tejidos sanos. La relación entre estas dos acciones (índice terapéutico) determina la toxicidad del fármaco a sus dosis eficaces antitumorales, que hay que asumir al administrarlo. El daño fotooxidativo, no se limita a las bases de ADN, la presencia de componentes de membrana oxidados, ha demostrado que la cantidad de productos de oxidación presente de forma endógena se incrementa después de una dosis de 10 Gy en un 30% (Ward 2002). Ambos tratamientos tienen un impacto adverso en la calidad de vida de muchos pacientes y se ha demostrado que la tasa de muerte dentro de los 30 días posteriores a la quimioterapia es cada vez mayor (Zdenkowski et al. 2012).

3.4.1 QUIMIOTERAPIA

El objetivo de la quimioterapia es inhibir la proliferación celular y la multiplicación de tumores, evitando así la invasión y la metástasis y se puede observar que la

inhibición del crecimiento tumoral puede tener lugar a varios niveles dentro de la célula y su entorno, pero esto da como resultado efectos tóxicos generalizados.

La quimioterapia implica el uso de medicamentos de bajo peso molecular para destruir selectivamente las células tumorales o al menos limitar su proliferación. Las desventajas de muchos agentes citotóxicos incluyen la supresión de la médula ósea, lesiones del tracto, caída del cabello, náuseas y desarrollo de resistencia clínica. Estos efectos secundarios ocurren porque los agentes citotóxicos actúan sobre células tumorales y células sanas, comenzó el uso de quimioterapia alrededor de 1940 con mostazas nitrogenadas, que son agentes alquilantes extremadamente potentes, y antimetabolitos. Desde el éxito inicial de estos tratamientos, se han desarrollado una gran cantidad de antineoplásicos adicionales (Hansen 2020).

Los medicamentos antineoplásicos se pueden clasificar según su mecanismo de acción, entre los cuales encontramos agentes que interactúan con el ADN, antimetabolitos, agentes anti-tubulina, agentes de dirección molecular, hormonas, anticuerpos monoclonales y otros agentes biológicos (Nussbaumer, 2011) y los efectos secundarios son un reflejo de su mecanismo de acción, la mayoría de los medicamentos de quimioterapia muestran actividad en las células que se multiplican rápidamente.

Se ha observado que la toxicidad periférica inducida por quimioterapia puede limitar la dosis y por lo tanto el efecto antineoplásico, además de que los signos y síntomas pueden ser permanentes y afectar gravemente la calidad de vida de los pacientes incluso después de la abstinencia del fármaco. A pesar de una extensa investigación, los mecanismos exactos de acción tóxica de los fármacos no se conocen completamente.

Existen estudios en los que debido a los efectos aleatorios durante la replicación celular y la muerte, habrá una distribución de los posibles tiempos de progresión tanto para el tratamiento agresivo como para la contención, hay dos posibles resultados, el primero es que la contención retrase la progresión en relación con el tratamiento agresivo o el segundo resultado posible es que la contención conduce realmente a una progresión temprana, sea cual sea el resultado no

resulta en una alternativa viable que puedo garantizar mejora para el paciente (Rizvi et al. 2020).

3.4.2 RADIOTERAPIA

La radiación ionizante ha sido una parte importante del tratamiento del cáncer durante casi un siglo, y se ha utilizado en radioterapia de haz externo, braquiterapia y terapia con radionúclidos dirigida. A nivel molecular y celular, la muerte celular se ha atribuido a la deposición de energía de la radiación en el ADN dentro del núcleo, y la producción de roturas de doble hebra del ADN desempeña un papel central. Sin embargo, este modelo centrado en el ADN ha sido cuestionado porque se han informado vías de muerte celular, en las que divergen las relaciones directas entre la muerte celular y el daño del ADN. Estas vías incluyen vías de señalización dependientes de la membrana y respuestas de espectadores (cuando las células responden no a la exposición directa a la radiación sino a la irradiación de sus células vecinas). Los nuevos conocimientos sobre los mecanismos de estas respuestas, junto con los avances tecnológicos en el direccionamiento de células en sistemas experimentales con microhaces, han llevado a una reevaluación del modelo de cómo las células mueren por la radiación ionizante (Prise et al. 2005).

La radiación actúa principalmente ionizando moléculas en los tejidos irradiados para causar daño al ADN, la energía de radiación se absorbe directamente en estructuras celulares críticas incluyendo ADN, orgánulos y membranas, o indirectamente a través de la inducción de radicales libres altamente reactivos en el citosol acuoso. La probabilidad de inducir el daño molecular por radicales libres transitorios aumenta en presencia de oxígeno molecular, que favorece la estabilización del daño bioquímico (Minniti et al. 2012).

El objetivo celular más importante para la radiación es inducir el daño en el ADN nuclear, se estima que cada gray (1 Gy) de radiación absorbida produce 105 ionizaciones por celda, que causan alrededor de 2000 fragmentaciones monocatenarias y 40 roturas de doble hebra en el ADN, además de otros tipos del daño del ADN, como el daño a las bases de nucleótidos, enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteína (Prise et al. 2005), es importante mencionar que como

la recombinación homóloga se limita a la fase S tardía y la fase G2 del ciclo celular, la mayoría de las roturas de ADN de doble cadena son reparadas por la vía de unión de extremos no homólogos, que es activo en todas las fases del ciclo celular (Ma et al., 2005), por lo que los efectos secundarios se asocia a náuseas, cefalea intensa, deshidratación, fiebre y pérdida de cabello, lo que condiciona la evolución de los pacientes y genera desequilibrios graves a nivel sistémico, es así que nace la necesidad de buscar terapias dirigidas y personalizadas que no provoquen efectos secundarios tan exacerbados y limiten la evolución clínica favorable de los pacientes.

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer representa un reto a nivel mundial por la complejidad de su desarrollo y fisiopatología, durante los últimos años se ha observado que la incidencia aumentó y la prevalencia de factores de riesgo asociados al crecimiento demográfico, urbanización y economía es cada vez mayor, es por eso que la investigación se ha enfocado en la comprensión del comportamiento y evolución de células tumorales hipo inmunogénicas capaces de evadir controles moleculares de crecimiento y división celular para ofrecer nuevas perspectivas terapéuticas y clínicas.

Es por lo anterior que surge la necesidad de buscar nuevas estrategias para el manejo y tratamiento del cáncer a través de medicina personalizada, que utiliza mecanismos de células del sistema inmunológico, de manera que pueda potenciar sus mecanismos de acción contra células tumorales específicas.

Actualmente existen diferentes tipos de inmunoterapias y una de las más prometedoras es la terapia de células adaptadas, entre las que resalta la terapia CAR-T por medio de transferencia génica con vectores virales, los pacientes tratados con esta inmunoterapia, han mostrado una remisión completa en un 60-80% de los pacientes tratados, por lo que resulta importante la comprensión y el fundamento biológico para el estudio y desarrollo de oportunidades de investigación y aplicaciones clínicas en nuestro país.

5. OBJETIVO GENERAL

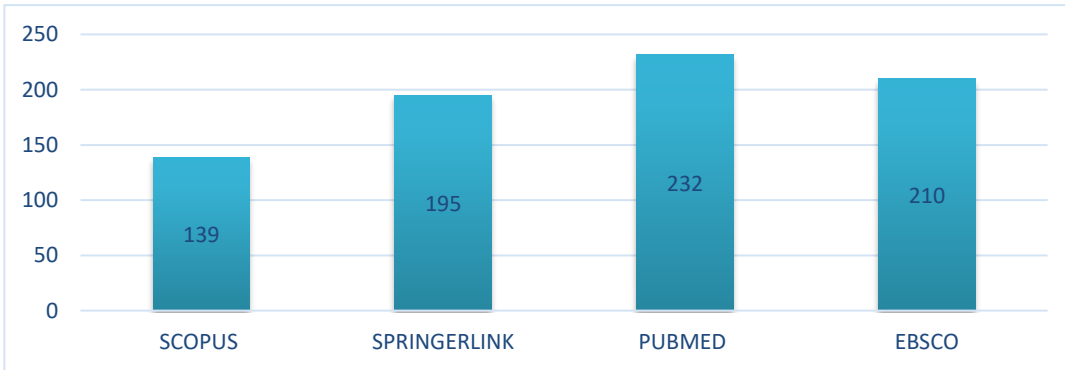
Realizar una revisión de artículos científicos de diferentes fuentes y autores para identificar los tipos de terapia oncológica con células T modificadas con receptores quiméricos generados por vectores virales.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una búsqueda empleando las palabras clave en 4 buscadores (EBSCO, SCOPUS, SPRINGERLINK, PUBMED).
- Determinar y aplicar los criterios de inclusión y exclusión para seleccionar los artículos.
- Clasificar los artículos seleccionados en grupos de estudio para Terapias dirigidas a antígenos tumorales con receptores de células T.
- Extracción de datos de importancia para redacción y revisión de inmunoterapia oncológica con receptores de antígeno quimérico.
- Revisar el impacto de la terapia con linfocitos T-CAR en la remisión completa, la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.
- Describir la estructura y tipos de Receptores de antígenos quiméricos.
- Explicar el proceso de generación de receptores de antígenos quiméricos con vectores virales de lentivirus, retrovirus y adenovirus.
- Evaluar las limitaciones y las perspectivas a futuro de la terapia con linfocitos T-CAR.

7. MÉTODO

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistematizada de artículos científicos a partir de las bases de datos Scopus, PubMed, Springerlink y EBSCO con las palabras clave *CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR + CANCER + IMMUNOTHERAPY*, con un total de 776 resultados.



immunotherapy+ cancer + chimeric antigen receptor	
HISTORIAL DE BUSQUEDAS	
EBSCO	210
SCOPUS	139
SPRINGERLINK	195
PUBMED	232
Total	776

Figura 5. Relación de artículos encontrados en los buscadores. EBSCO, PubMed, Scopus y Springerlink.

Los resultados de búsqueda de cada una de las bases de datos se exportaron en formato CVS. Para compilarlos en un único documento de Excel, con su respectiva hoja de cálculo, que posteriormente, se ingresaron en una sola hoja de cálculo ordenados en filas por: **Autores, Título, Tipo de publicación, Año y DOI**; a continuación, se aplicaron filtros y eliminaron de una forma ordenada las publicaciones que no estuvieran dentro de los criterios de inclusión siguientes:

- Artículos publicados entre los años 2000-2021
- Ensayos clínicos o artículos originales
- Publicaciones en idioma inglés
- Ensayos clínicos de terapia CAR-T

Y se establecieron los siguientes criterios de exclusión:

- Artículos publicados antes del año 2000
- Artículos en chino, alemán o español
- Artículos que incluyeran la palabra “vaccine, surgery, transplant, conference, abstract, meeting, virus o symposium”
- Artículos que describieron terapia CAR-T contra enfermedades autoinmunes

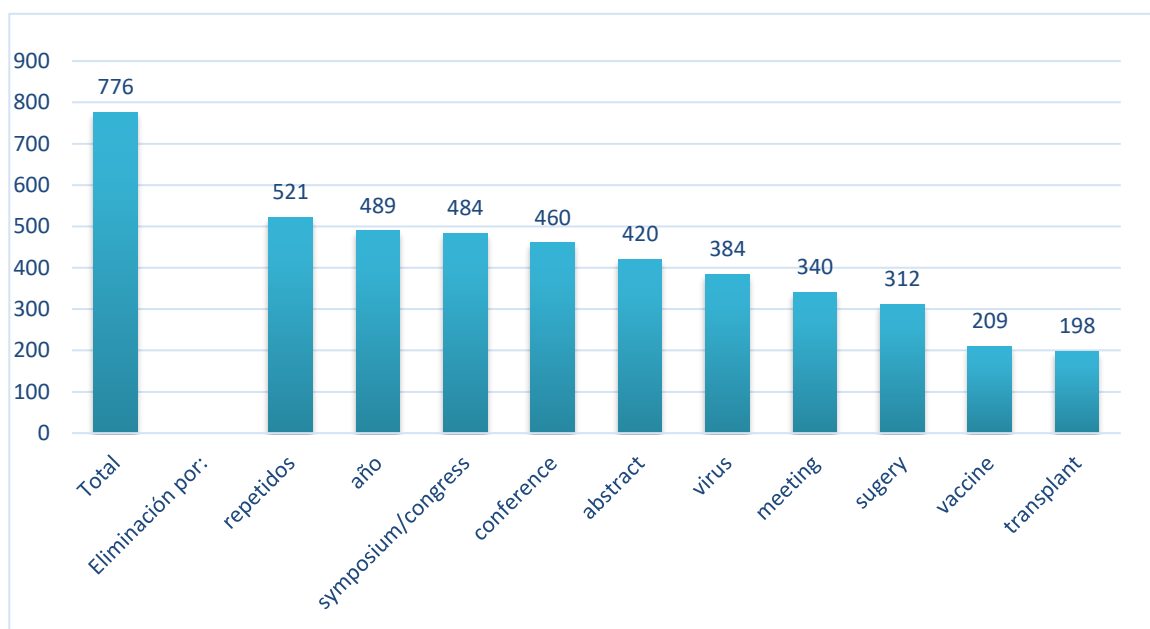


Figura 6 Gráfica de artículos filtrados y eliminados consecutivamente según su contenido

Filtrado de artículos	
Total	776
Eliminación por:	
repetidos	521
año	489
symposium/congress	484
conference	460
abstract	420
virus	384
meeting	340
sugery	312
vaccine	209
transplant	198

Figura 7. Gráfica de los artículos totales y eliminación sistemática por criterios de contenido para conservar únicamente los artículos relevantes.

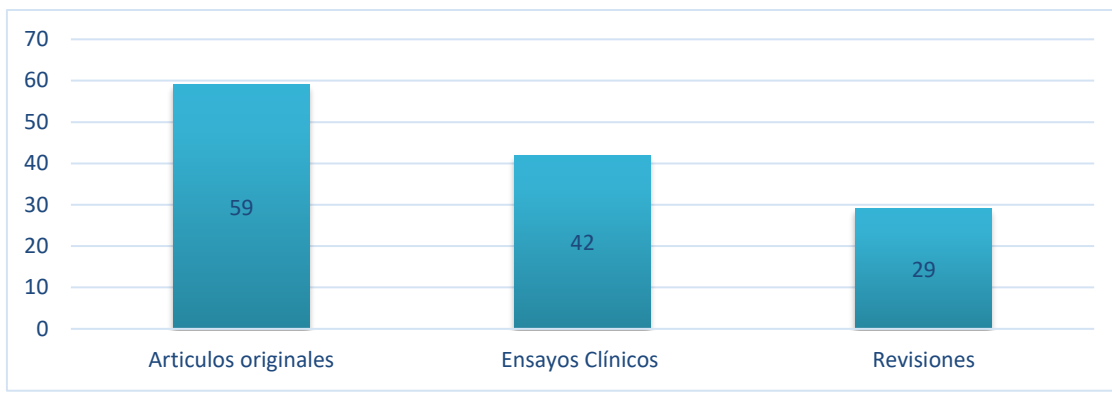
Una vez que se eliminaron los artículos repetidos y filtrados los que no cumplían los criterios de inclusión y de exclusión, se clasificaron en tres clases de publicaciones:

- Revisiones Bibliográficas
- Ensayos clínicos
- Artículos originales

De los cuales se identificaron 2 grupos de terapia CAR-T según el tipo de cáncer al que se dirige:

- Tratamiento con CAR-T para cáncer hematológico
- Tratamiento con CAR-T para tumores sólido

Por último, se eliminaron los ensayos clínicos que en el proceso de manufactura utilizaron medios no virales recombinantes para la generación del receptor quimérico y así basar los resultados de la revisión únicamente en los tratamientos aprobados por la FDA y la EMA para evidenciar la eficiencia de su uso para pacientes diagnosticados con cáncer hematológico.



BLOQUES	
Artículos	59
Ensayos clínicos	42
Revisiones	29
	139

Figura 8 Gráfica de los artículos totales y eliminación sistemática por criterios de contenido para conservar únicamente los artículos relevantes.

El total de los Artículos utilizados fueron de 139 de los cuales 59 fueron artículos originales, 29 revisiones bibliográficas y 42 ensayos clínicos que aportan información de calidad para todo el contenido de investigación realizado en este trabajo, donde se ha documentado y observado el efecto de la terapia CAR-T para neoplasias hematológicas.

8. DESARROLLO

8.1 MEDICINA PERSONALIZADA

Durante la última década se han dedicado enormes esfuerzos para el desarrollo de terapias, que utilizan mecanismos antineoplásicos de células del sistema inmune o citocinas proinflamatorias, diseñando respuestas inmunes específicas ya existentes, contra células antineoplásicas (Han, 2018). Estas investigaciones en fases preclínica y clínica han logrado la aprobación de diversas intervenciones inmunoterapéuticas para su uso en humanos.

Los estudios clínicos actuales se han realizado para probar la seguridad y eficacia en diferentes condiciones, combinando inmunoterapéuticos y terapias convencionales en pacientes con cáncer, ya sea como intervenciones independientes, lo que sigue en proceso de aprobación regulatoria (Couzin-Frankel, 2013).

El uso de la inmunoterapia depende de la inducción de una respuesta inmune antitumoral específica, ya que, numerosos estudios han demostrado que tanto la inmunidad innata como la adquirida son capaces de reconocer muchos antígenos del tumor, y desencadenar una respuesta antitumoral frente a tumores en desarrollo, y las podemos clasificar como "pasivas" o "activas" en función de su capacidad para activar el sistema inmunológico del huésped contra las células malignas. Desde este punto de vista, los anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos a tumores y las células T transferidas adaptativamente se consideran formas pasivas de inmunoterapia, ya que están dotados de actividad antineoplásica intrínseca. Por el contrario, las vacunas contra el cáncer y los inhibidores de puntos de control ejercen efectos anticancerígenos solo sobre la participación del sistema inmunológico del huésped, lo que constituye claros ejemplos de inmunoterapia activa, (Fremd et al 2013).

INMUNOTERAPIA PASIVA	INMUNOTERAPIA ACTIVA
Anticuerpos monoclonales	Citocinas inmunoestimuladoras
Transferencia de células adaptadas	Inductores de muerte celular
Virus oncolíticos	Agonista de PRR Agonista NOD 2

Figura 9. Tabla descriptiva de clasificación de inmunoterapias aceptadas por la FDA (Galluzi 2014)

8.1.1 TERAPIA CON TRANSFERENCIA DE CÉLULAS ADAPTADAS

El término "transferencia celular adaptada" (ACT por sus siglas en inglés) se refiere a una variante particular de inmunoterapia anti cáncer basada en células autólogas modificadas que inducen una respuesta inmunológica antineoplásica, la evidencia demuestra que es una de las terapias con más casos de éxito en la fase clínica, y ha demostrado efectos curativos reales en pacientes con algunos tipos de cáncer hematológico, el proceso para lograr la reinfusión de las células modificadas, consiste en la recolección de linfocitos circulantes o infiltrantes de tumores al extraer sangre periférica del paciente, su selección o aislamiento, la modificación por medio de ingeniería genética o vectores virales recombinantes, el proceso de expansión, activación *ex vivo*; y por último, la administración a los pacientes, con mayor frecuencia después del precondicionamiento linfodepletor, que consiste en algún ciclo de quimioterapias o radioterapia o en combinación con agentes inmunoestimuladores (Renrick et al 2019). Otras inmunoterapias contra el cáncer, que implican la reinfusión de células vivas, es el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH), que implica la reintroducción de una población celular enriquecida con efectores inmunes potencialmente reactivos al tumor, y se emplea como un medio para reconstituir un sistema inmunológico sano, alogénico (y por tanto potencialmente reactivo al tumor), en pacientes con neoplasias hematológicas previamente sometidas a tratamientos que provocan depleción de linfocitos (Torre, 2015). Las intervenciones basadas en células dendríticas (DC) también deben diferenciarse conceptualmente de ACT por dos razones. En primer lugar, las poblaciones de células dendríticas reinfundidas no están dotados de actividad anticancerosa intrínseca, sino que actúan como vacunas anticancerosas para provocar una respuesta inmunitaria dirigida al tumor, y en segundo lugar, no se administran en el contexto de la quimioterapia (radioterapia) linfoblástica / mielosupresora (Galluzi, 2014).

8.2 TERAPIA CAR-T

La transferencia de células adoptivas (ACT) que utiliza células T modificadas con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) puede inducir remisiones duraderas en pacientes con cánceres hematológicos, al contrario de tumores malignos sólidos donde se han observado resultados modestos. El principio fundamental de la terapia es el aislamiento de células T específicas del cáncer, y la expansión fuera del entorno potencialmente inmunosupresor de un paciente con cáncer a cantidades terapéuticas antes de la reinfusión. (Chandran, 2019)

Existen algunos factores condicionantes para la tasa de efectividad de las terapias de transferencia adoptiva como la linfodepleción del huésped antes de la transferencia de células T, y la especificidad genética del cáncer asegurada mediante la ingeniería genética para introducir un receptor de antígeno exógeno que coincida con el complemento de antígenos expresados por el cáncer de un paciente, y por último, la selección de poblaciones específicas de células T con potencial proliferativo, y de supervivencia mejorada, incluidos los subconjuntos de memoria de células madre T mínimamente diferenciada y memoria central T. Finalmente, debido a que las células T terapéuticas se expanden *ex vivo*, el huésped portador del tumor puede estar pre acondicionado para agotar las poblaciones de células inmunosupresoras antes de la reinfusión de células T, estas indicaciones, las células T se modifican genéticamente con un receptor de antígeno sintético derivado de un anticuerpo monoclonal denominado receptor de antígeno quimérico (CAR) (Sermer, 2019).

Actualmente, el tiempo transcurrido desde la recolección de CAR-T hasta la reinfusión al paciente, es de aproximadamente 3 semanas, la linfagénesis para la fabricación de células T con CAR implica recolectar cantidades específicas de linfocitos CD3 + de los pacientes, las células mononucleares de sangre periférica se extraen del paciente mediante un procedimiento de leucocitaféresis de gran volumen (Boyiadzis, 2018). Luego, las células se transfieren a una instalación de fabricación de GMP, para la ingeniería y

expansión de células T, a continuación, las células T del paciente se incuban, y por medio de ingeniería genética o vectores virales, se introducen el ARN del gen CAR. Luego, el ARN CAR se transcribe de forma inversa en ADN, que se recombina en el genoma de las células T, lo que da como resultado la incorporación permanente del gen CAR (Neelapu et al 2019).

Posteriormente las células T transformadas experimentan una expansión *ex vivo* durante varios días, lo que da como resultado un producto que es 90% de células T CD3 +, pero fracciones variables de las cuales son CAR. Las células se transfieren de nuevo al centro para la infusión y las recomendaciones de infusión de células CAR-T varían según los centros, patrocinadores y productos (Allen et al 2017).

Los protocolos existentes incluyen reinfusiones para pacientes hospitalizados y ambulatorios, y la dosis depende de la población total de CAR + en el producto de infusión, así como de las características del paciente, incluida la edad y el peso, cabe destacar que estudios recientes de varios pacientes que respondieron positivamente identificaron un solo clon de células T con CAR que constituía el 94% de la población total de células T con CAR en la infusión administrada, estos datos sugieren que la reinfusión de una sola célula T CAR puede promover la respuesta terapéutica (Fu et al 2019).

8.2.1 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

Como lo implica el nombre "quimera", un CAR es un receptor de antígeno de cadena simple totalmente sintético compuesto por 3 dominios distintos: un dominio de reconocimiento de antígeno con su región de bisagra extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de señalización de células T intracelular (Chandran, 2019) son receptores diseñados y específicos de tumores que se reprograman genéticamente *in vitro* utilizando los linfocitos T del propio paciente, y se unen a un antígeno tumoral de una manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que permite que

las células T reconozcan y eliminen a la célula tumoral al reconocer un antígeno. Los receptores de antígenos quiméricos, son receptores modificados que acoplan un dominio Fv de cadena sencilla anti-CD19, a dominios de señalización de células T intracelulares del receptor de células T, redirigiendo así a los linfocitos T citotóxicos a las células que expresan este antígeno (Cai, 2020).

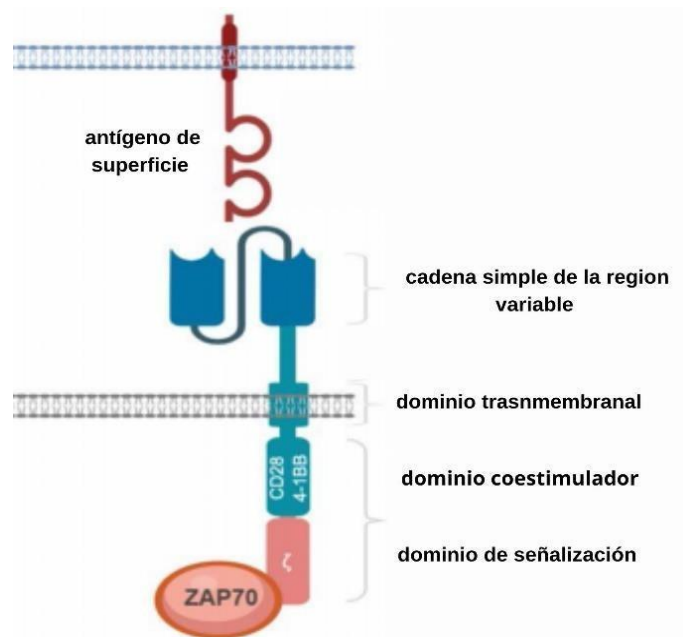


Figura 10. Elementos que componen cada uno de los dominios de un receptor de antígeno quimérico (Imagen modificada, Sermer 2019). CAR, receptor de antígeno quimérico; scFv, dominio variable monocatenario de un anticuerpo; TCR, receptor de células T. (Castro 2019)

Los CAR constan de tres dominios principales: un ectodominio, un dominio transmembranal y un endodominio. El ectodominio es la porción extracelular del receptor que incluye el dominio de reconocimiento de antígeno así como un péptido señal para la dirección al retículo endoplásmico, este dominio es el dominio vinculante, comúnmente derivado de la cadena simple de fragmento variable (scFv), que teóricamente puede reconocer cualquier tipo de antígeno (Zhao et al. 2009), y es importante mencionar que este dominio es derivado de un anticuerpo monoclonal que contiene una secuencia no humana (p. ej.,

primate, conejo o ratón), pueden provocar respuestas inmunogénicas en pacientes y ampliar su alcance de antígenos diana, independientemente de su restricción de MHC (Turtle et al. 2016).

El dominio bisagra fue introducido para proporcionar cierto grado de flexibilidad, para incrementar la eficiencia de reconocimiento de las células diana por las células CAR-T. Además de tamaño, ubicación y distribución del epítipo de los antígenos diana, por lo tanto, un dominio espaciador o bisagra excesivamente largo puede tener un efecto negativo en la activación de las células CAR-T (Guest et al 2005).

El dominio transmembrana apoya principalmente la estabilidad de CAR, el endodominio intracelular facilita la transducción de señales para activar las células T, durante el reconocimiento de antígenos, es una proteína transmembrana que se expresa en la superficie de las células T mediante biotecnología (Zhang 2017) hasta la fecha, el dominio transmembrana se ha considerado como un componente inerte con respecto a la señalización CAR pero se ha observado que al estar en contacto con la región hidrofóbica de la membrana está formada por componentes polares, y se relaciona con la transmisión de la señalización CAR-T (Guedán et al. 2014).

En el diseño CAR de primera generación, el intracelular parte de CD3 ζ , que es la principal cadena de señalización del TCR, o FcR γ , que es la cadena de señalización de la Fc receptor, se utilizó principalmente como dominio de señalización. Aunque los dominios de señalización CD3 ζ , y FcR γ contienen una caja ITAM (activación basada en inmunoreceptores de tirosina cinasa) que es una secuencia para reclutar elementos de señalización (Hamerman et al 2006)

Existen 4 diferentes generaciones de CAR, el diseño de los de primera generación se hizo de manera similar al complejo TCR endógeno incorporando una cadena CD3 ζ un dominio intracelular Fc ϵ R1 γ , pero en su lugar incorporaron dominios extracelulares de reconocimiento de antígenos que permitieron el reconocimiento directo de antígenos en la superficie de las células tumorales, lo que permitió que el MHC sea independiente a la activación de células T (Boyiadzis, 2018).

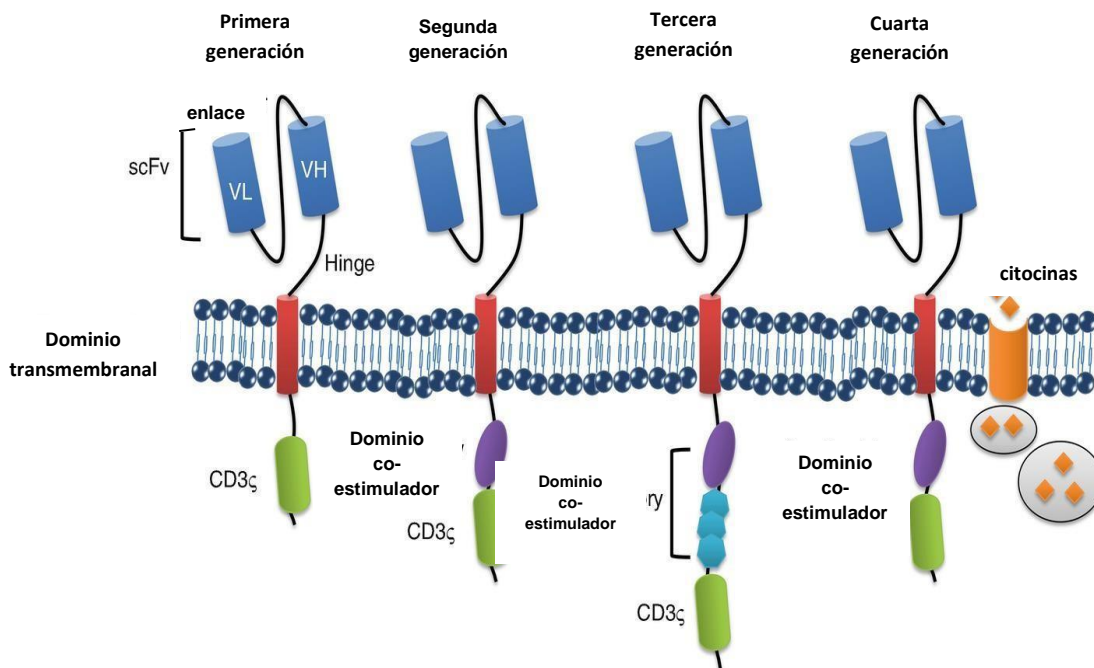


Figura 11. Representación esquemática de la estructura CAR. Las células CAR T se componen de tres partes: dominio scFv, dominio transmembrana y un dominio de transducción de señales del TCR. Los CAR de primera generación utilizaron un CD3ζ como dominio de transducción de señales del TCR, mientras que los CAR de segunda generación incluyen dominios de señalización coestimuladores adicionales (CD28 o 4-1BB). Los CAR de tercera generación constan de dos dominios coestimuladores distintos, como CD28 y 4-1BB. Los CAR de cuarta generación también están blindados con genes que permiten, por ejemplo, la expresión de citocinas. (Imagen modificada, Zhao et al 2019)

Es importante destacar que estos diseños de primera generación, no incluyen dominios coestimuladores para proporcionar la segunda señal para la activación completa de los linfocitos T, por lo que son más susceptibles a la apoptosis y tienen una expansión a largo plazo muy limitada (Han 2018) por este motivo la evolución de la terapia ha buscado superar la falta de estimulación de los CAR de primera generación, agregando dominios de señalización coestimuladores, tales como CD28, CD137 (41BB), o CD134 (OX40), lo que demostró un aumento en la persistencia y eficacia antitumoral en modelos animales, apareciendo así los CAR de segunda generación, y de manera similar, se ha demostrado una expansión, y persistencia

significativamente mejoradas de las células CAR-T de segunda generación en humanos cuando se infundieron simultáneamente células CAR-T de primera y segunda generación dirigidas a CD19 en pacientes con linfoma de células B (Pegram et al 2014). De hecho, las CAR-T de segunda generación demostraron una proliferación vigorosa, así como persistencia más prolongada *in vivo*, lo que lleva a mejores tasas de respuesta en los ensayos clínicos. Como resultado, en 2017, la FDA dos productos de células CAR-T de segunda generación: Kymriah y Yescarta, que se basan en el coestimulador 41BB y CD28 dominios de señalización, respectivamente. (Lee 2019), por esta razón los CAR de segunda generación con un dominio coestimulador CD28-4-1BB, han entrado a la práctica clínica dirigidas a CD19 específicamente, mostrando seguridad y eficacia clínica sólida, en el tratamiento de adultos con leucemia linfoblástica aguda de células B CD19+ e infantil en experimentos independientes. Aunque la viabilidad de la terapia con células T con CAR en el tratamiento de la leucemia / linfoma está claramente demostrada en los diferentes ensayos hubo diferencias en la eficacia, y el resultado que merecen una evaluación clínica en los estudios de fase II, y es por este motivo que se inició el desarrollo de la 3ra y 4ta generación de receptores para probar su funcionalidad no solo en neoplasias hematológicas, también en tumores sólidos (Bernardes et al 2020).

Los CAR de tercera generación están diseñados para contener un dominio CD3 ζ y dos dominios de señalización coestimuladores, incluidos CD28, CD27, 4-1BB u OX40 (CD134); de estos, CD28 y 4-1BB han sido los más utilizados recientemente. (Hay et al 2019). En estudios preclínicos, la eficacia antitumoral de los CAR de tercera generación es superior a la de los CAR de segunda generación (Han, 2018).

Por último se han desarrollado los CAR de cuarta generación denominados TRUCK o CAR blindados, están diseñados con la capacidad de secretar interleucina 12 (IL-12), lo que mejora la eficacia antitumoral y ayuda a superar el microambiente del tumor sólido hostil y han demostrado que las células T blindadas inducen el agotamiento de los macrófagos asociados a tumores (Chmielewski, 2015), y reducen la inhibición mediada por el ligando 1 de muerte programada endógena (PD-L1) en presencia de ascitis inmunosupresora.

Los resultados obtenidos utilizando células CAR-T blindadas, se ha observado la disminución de la apoptosis, la proliferación mejorada y la citotoxicidad aumentada, enfatizan aún más la capacidad del diseño optimizado para mejorar la eficacia antitumoral, especialmente en el entorno inmunosupresor de tumores sólidos. (Yeku et al 2016). Las células TRUCK representan células T redirigidas a CAR que producir de forma constitutiva una proteína transgénica y liberan la proteína tras la participación de CAR de objetivo, están destinadas a depositar una variedad de proteínas terapéuticas en el tejido diana con el fin de alcanzar localmente concentraciones terapéuticas y evitar la toxicidad sistémica (Cai et al 2020).

8.2.2 DESARROLLO DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

La composición óptima del CAR es crucial para una inmunoterapia eficaz contra el cáncer, contienen un scFv de un anticuerpo como dominio de unión extracelular para el reconocimiento de antígenos independientes de HLA, un dominio transmembrana (TM), y una cadena CD3 ζ como dominio de señalización intracelular.

La estabilidad adicional del CAR puede obtenerse mediante un dominio espaciador extracelular sin señalización entre el scFv y el dominio TM (Enblad et al 2018). El diseño CAR se ha desarrollado más a lo largo de varias generaciones desde su introducción. Los CAR 1G se diseñaron sin un dominio coestimulador, e indujeron la activación de las células T solo por la señal primaria a través del dominio de señalización CD3 ζ . Las células CAR-T que dependen sólo de CD3 ζ para la señalización mostraron una baja capacidad de producción de citocinas, una expansión insuficiente de las células T, y rápidamente se volvieron anérgicas. Estas células CAR-T basadas en CD3 ζ disponen de una capacidad citotóxica específica de antígeno suficiente, sin embargo, la expansión de las células T fue débil. (Hombach, 2007).

Esta modificación mejoró las propiedades *in vivo* de las células CAR-T, y protegió las células CAR-T de la apoptosis. La persistencia *in vivo* se vio significativamente influenciada por los dominios coestimuladores insertados. Se

ha descrito que CD28, como dominio coestimulador, apoya una expansión más fuerte de las células T y una mejor erradicación del tumor, mientras que 4-1BB, como dominio coestimulador, se asocia con una persistencia prolongada y mejora el desarrollo del agotamiento

La combinación de dos dominios coestimuladores en un 3G CAR podría tener el potencial de combinar estas dos ventajas. La infusión simultánea de células CAR-T específicas de CD19 2G (CD28) y 3G (CD28 / 4-1BB) en pacientes mostró que las células CAR-T 3G tenían propiedades superiores de expansión y persistencia. Además, se demostró que la actividad de señalización intracelular de las células 3G CAR-T era mayor que la de las células 2G CAR-T y probablemente conducía a una proliferación celular superior (Enblad et al 2015).

Un mayor desarrollo del CAR condujo a CAR de cuarta generación (4G) y células T redirigidas para la destrucción universal mediada por citocinas (TRUCK). Estos nuevos CAR 4G expresan moléculas debido a modificaciones genéticas complementarias dentro del constructo CAR para mejorar la eficacia terapéutica de la terapia celular CART (Chmielewski 2014). Los TRUCK son CAR-redirigidos que pueden producir y liberar un producto transgénico, por ejemplo, una citoquina proinflamatoria en el sitio del tumor. Se informó que las células CART específicas de CD19 que secretan IL-12 erradican la enfermedad tumoral establecida sin un régimen de acondicionamiento previo. Debe mencionarse que las células T secretoras de IL-12 dirigidas a tumores se volvieron resistentes contra la inhibición mediada por células T reguladoras (Pegram 2012). La integración de un casete de citocinas IL-12 inducible por CAR conduce a la secreción de IL-12 después de la señalización de CAR y, por lo tanto, a la acumulación y mantenimiento de niveles terapéuticos de la citocina en el tejido diana, lo que conduce a la destrucción de TAA que expresa células y células tumorales TAA-negativas. Una desventaja es que solo los sitios tumorales que expresan el antígeno pueden iniciar la liberación de IL-12. Esta estrategia debe aplicarse con precaución: es necesario el uso de citocinas con perfiles de toxicidad seguros y liberación controlada de citocinas. Además, se informó de que las células CART blindadas que se han modificado para expresar enzimas

degradantes mostraron una capacidad mejorada para infiltrarse en los sitios del tumor.

La ingeniería de linfocitos T para expresar anticuerpos quiméricos que se dirigen a antígenos tumorales se ha estudiado durante más de 20 años. El progreso clínico se había visto limitado por la escasa expansión in vivo de las células T modificadas y la falta de persistencia de estas células después de la infusión. (Maude 2014) Existen diferentes estudios y ensayos clínicos que evidencian los factores que condicionan la tasa de éxito de la terapia, como la clase de generación del receptor, la capacidad de proliferación de la población de los linfocitos o la capacidad del linfocito para evadir el microambiente tumoral (Kochenderfer et al 2010).

Se asumió que el número de células CART transfundidas determinaba principalmente el éxito terapéutico en una etapa temprana de la terapia con células CART. Sin embargo, por encima de cierto umbral, el número absoluto de células CART transfundidas no se correlaciona directamente con la expansión in vivo y el éxito terapéutico (Schubert 2016). En consecuencia, otros factores además del número absoluto de células CART transfundidas podrían ser más importantes para la eficacia de las células CART. Por ejemplo, la composición celular y el fenotipo de las células T transferidas, incluidos los subtipos y subpoblaciones de células T, se identificaron como uno de los factores de éxito más críticos para una inmunoterapia eficaz (Busche et al 2016). El proceso de producción de células CART va desde la recolección de la muestra por medio de venopunción a pacientes diagnosticados con cáncer posteriormente el aislamiento inicial y el enriquecimiento de las células T, la preparación de las células CART, incluida la activación, la expansión de las células T, la transferencia génica por un medio no viral o sistemas de vectores virales, seguidos de expansión de células CART ex vivo y por último el producto celular final se somete a una formulación de final de proceso y criopreservación. Las pruebas de control de calidad se realizan durante la producción, así como para el producto final de células CART criopreservadas para garantizar la integridad del producto, además cabe mencionar que un factor importante antes de aplicar la infusión autóloga con las poblaciones de células modificadas, es que los

pacientes suelen recibir un tratamiento de depleción linfoide (Raje et al 2014) antes de la administración del producto de células CART finalmente aprobado.

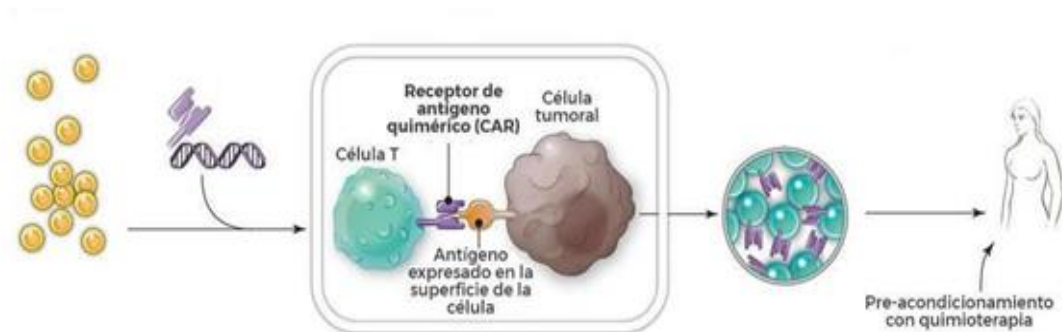


Figura 12 Las células T y CAR y las células T y TCR se manipulan para que produzcan receptores especiales en sus superficies. Se expanden luego en el laboratorio y se regresan al paciente. (NCI 2017)

8.2.3 AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO DE LINFOCITOS T

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtienen comúnmente a partir de una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll para la eliminación de granulocitos, glóbulos rojos y plaquetas. Alternativamente, se pueden emplear lavadores de células automatizados para aislar células T (Spear et al 2013).

La composición celular al comienzo del proceso de producción puede influir en el fenotipo de las células CART, ya que los pacientes con un alto número de células tumorales, como los pacientes con leucemia sin tratar, mostraron un bajo número de linfocitos T menos diferenciados dentro de su conteo de células mononucleares en sangre periférica (Stock, 2019). Los elementos celulares endógenos pueden ser un sumidero de citocinas suplementadas y, por lo tanto, pueden reducir los efectos mediados por las citocinas en las células CART. Por tanto, la selección de células T CD3 + podría ser necesaria en pacientes con un número elevado de células tumorales circulantes en sangre periférica.

8.2.4 ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

La activación de las células T representa un paso indispensable de la producción de células CART. La activación óptima debería conducir a una expansión suficiente de células T sin causar una diferenciación inmensa de células T o muerte celular inducida por activación (AICD). Las células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas (DC), median la activación fisiológica de las células T. Los países en desarrollo vienen acompañados de una aplicación clínica y de laboratorio difícil, por lo que los países en desarrollo no son prácticos para la terapia con células CART. Se han desarrollado estrategias de activación simplificadas para evitar el uso de APC como activadores endógenos para la activación de células T *ex vivo* (Kochenderfer et al 2012).

Las ventajas adicionales se refieren al proceso de fabricación de células CART en sí, el enriquecimiento y el lavado se simplifican más, ya que las perlas unidas a las células se pueden retener magnéticamente. Además, las perlas sin la eliminación de las perlas pueden realizar la selección y activación hasta el final de la expansión y se puede reducir la pérdida de costosos anticuerpos estimulantes durante el intercambio de medios (Vormittag et al 2018). Por lo tanto, se supone que las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 / anti-CD28 son la estrategia de activación más prometedora. En ensayos clínicos recientes, se usan perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo anti-CD3 / anti-CD28 con frecuencia, por ejemplo, para la producción de Kymriah (Tisagenlecleucel; CTL019) y Lisocabtagene maraleucel (liso-cel; JCAR017), mientras que para la producción de Yescarta® (Axicabtagene Ciloleucel; KTE-019) se utilizan anticuerpos anti-CD3 con IL-2 (Locke, 2017).

8.2.5 SISTEMA DE TRANSFERENCIA DE GENES POR TRANSDUCCIÓN VIRAL

Los vectores de transferencia de genes no virales o virales que transfieren la información genética correspondiente a las células T median la expresión de CAR en la superficie de las células T. Los sistemas de transposón / transposasa

basados en plásmidos y los vectores virales, incluidos los vectores gamma-retrovirales y lentivirales, así como la edición del genoma y la electroporación de ADN desnudo, se aplican para la administración de genes en la terapia celular CART (Ying et al 2019).

Los sistemas de administración de genes basados en virus se utilizan comúnmente y pueden lograr altas tasas de eficiencia, entre los sistemas de vectores virales utilizados con más frecuencia se encuentran los vectores gamma-retrovirales y los vectores lentivirales, que pertenecen a la familia de los retrovirus. Los retrovirus median una expresión génica estable a largo plazo, ya que el ADN viral producido se integra en el ADN del huésped.

Los lentivirus necesitan genes reguladores para neutralizar la defensa de la célula huésped y debilitar la respuesta inmune, así como para regular la replicación viral. El riesgo de mutagénesis insercional y oncogenicidad parece ser bajo con los vectores lentivirales. (Svoboda et al 2018). Casi no se conocen efectos genotóxicos de la transferencia de genes a células diferenciadas, incluidas las células T. Hasta ahora, sólo se han informado unos pocos casos de transformación mediada por virus en pacientes tratados con células T modificadas genéticamente. Se observó una inserción del transgén CAR mediada por un vector lentiviral en un paciente con CLL tratado con células CART específicas de CD19, lo que provocó una alteración del gen TET2 de la metilcitosina dioxigenasa. Estas células CART interrumpidas por TET2 mostraron una diferenciación de células T modificada que condujo a un fenotipo de memoria central en el máximo de proliferación. Aunque la mutagénesis por inserción no es deseable, la modificación de TET2 descrita podría usarse para una optimización de la terapia con células CART. Se observó un caso adicional de expansión clonal en un paciente que fue tratado con células CART específicas de CD22 causadas por la integración mediada por vectores lentivirales en el gen CBL que es importante para la regulación de las respuestas de las células T. Además, la mutagénesis de inserción condujo al escape del tumor en un paciente que recaía después del tratamiento con células CART específicas para CD19 con una leucemia negativa para CD19. En este caso, el gen CAR se introdujo involuntariamente en una única célula B leucémica durante el proceso de

producción de células CART, lo que provoca un disfraz de reconocimiento. Hasta donde sabemos, todavía no se ha informado de inserciones accidentales para los vectores gamma-retrovirales utilizados para la terapia celular CART. Por lo tanto, los gamma- retrovirus todavía se usan ampliamente y se consideran un sistema de vector seguro para el TCA clínico (Tong et al 2020).

Mientras que para la producción de vectores retrovirales se pueden utilizar líneas celulares de empaquetamiento estables, la producción de vectores lentivirales requiere grandes cantidades de ADN plasmídico para la transfección transitoria. Un requisito previo para la administración eficaz de genes virales es la presencia de células T en división después de la activación de las células T, en particular para la transferencia de genes retrovirales. La producción de vectores intensiva y costosa es una desventaja importante de los sistemas de transferencia de genes virales, ya que se requieren instalaciones adecuadas de sala limpia y la realización de pruebas de liberación de vectores para las células transducidas retroviralmente o lentiviralmente. Esto se ha convertido en un cuello de botella importante, incluso para las grandes farmacéuticas en este campo (Scholler et al 2012).

La transducción lentiviral de administración de se utiliza para la producción de Kymriah[®] (Tisagenlecleucel) para el tratamiento de Leucemia linfoblástica aguda o linfoma no Hodgkin, los vectores virales median una eficiencia de transferencia de genes suficiente y conducen a productos seguros. Sin embargo, la producción de vectores virales sigue siendo un aspecto complicado y, por lo tanto, costoso en la producción de células CART (Morgan et al 2018).

Los eventos que siguen a la transducción se parecen mucho a los de una verdadera infección, tras la fusión de la membrana viral y del huésped, el núcleo del virión se libera en el citosol y se transporta a lo largo de los microtúbulos para llegar al núcleo. Una membrana nuclear rota es absolutamente crucial para su entrada en el núcleo y, como tal, la transducción productiva por los vectores gamma-retrovirales depende estrictamente de la mitosis de la célula diana.

Se han utilizado eficazmente vectores gamma retrovirales para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) en linfocitos T. Normalmente, las

células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes se estimulan con anticuerpos monoclonales (MAb) anti-CD3 y anti-CD28 junto con IL-2 exógena para seleccionar y expandir las células T dentro de los linfocitos de sangre periférica (PBL). Estos se transducen posteriormente con el sobrenadante de vector generado a partir de líneas celulares de empaquetamiento de vector de alto título (VCP) como PG13. Dichas líneas celulares de empaquetamiento se generan mediante transfección transitoria de la construcción CAR en combinación con genes virales esenciales, que se proporcionan en *trans*. Si se desea, se selecciona la integración estable de estos transgenes mediante el uso de casetes estándar de resistencia a antibióticos. Cuando se combina con sistemas de promotores inducibles, este enfoque permite la generación de líneas de células productoras estables en las que la producción de virus se induce mediante la adición de una molécula pequeña como la tetraciclina.

En el caso de la inserción del promotor, la genotoxicidad resulta de la inserción de unidades promotoras virales fuertes directamente corriente arriba de las unidades de transcripción celular diana. La activación oncogénica en este escenario está restringida a eventos de inserción corriente arriba y en marco con el oncogén resultante, ya que el promotor viral influye directamente en la transcripción de un gen huésped. La activación del promotor, por otro lado, es el resultado del potenciador en la LTR viral que actúa sobre el promotor de un protooncogén. Este efecto no depende de la orientación o la concordancia del marco entre la inserción y el promotor diana, y puede funcionar a una distancia de varias kilobases. La activación del promotor se ha implicado como el evento mutacional más común observado en los ensayos clínicos de terapia génica (Gu, 2020).

8.2.5.1 VECTORES VIRALES

El descubrimiento de Harold Varmus y Michael Bishop en 1976 de que la actividad oncogénica del virus del sarcoma de Rous (RSV, un retrovirus alfa) es el resultado de la transferencia mediada por virus de ADN no viral proporcionó la base para el uso de vectores retrovirales en biología sintética. Los vectores

virales de la familia Retroviridae son ahora los vectores más utilizados para aplicaciones de terapia génica, las principales ventajas de los vectores de transferencia de genes virales son la relativa facilidad de fabricación y producción, así como su capacidad para integrar de forma estable material genético en el genoma del huésped. Para cumplir con los estándares de seguridad clínica, las plataformas de vectores virales deben demostrar incompetencia de replicación, baja genotoxicidad y baja inmunogenicidad. (OMS, 2001)

8.2.5.1.1 VECTORES LENTIVIRALES

Los vectores basados en lentivirus son estructuralmente similares a sus homólogos gamma retrovirales, en los que los genes virales esenciales se reemplazan con un transgén de interés y el genoma viral se integra de forma estable en la célula huésped. El elemento activo exclusivo del vector lentiviral es el tracto central de polipurina (cPPT) señal de terminación central (CTS), cuya función es facilitar la importación nuclear del complejo de preintegración tras la infección (Mitsuyasu, 2006).

A diferencia de los gamma-retrovirus, la transducción del vector lentiviral, por lo tanto, no se rige por la división celular, lo que permite la transducción eficaz de una amplia gama de tipos de células, incluidas las células diferenciadas terminalmente sin ciclos. La pseudotipificación con proteína g del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) amplía aún más el tropismo del vector, ya que los receptores celulares para VSV-G se expresan de forma ubicua en células humanas. Este misterio se resolvió, al menos parcialmente, cuando se identificó el LDL-R (receptor de lipoproteínas de baja densidad) como el receptor celular humano para VSV-G, y se demostró que la expresión de LDL-R es relativamente baja en las células madre hematopoyéticas y células T en reposo (Do et al 2020).

Los vectores lentivirales más utilizados se basan en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Naturalmente, las preocupaciones sobre la generación de partículas competentes para la replicación han hecho necesario el desarrollo de vectores lentivirales cada vez más sofisticados con múltiples salvaguardias. Similar a los vectores retrovirales gamma, los sistemas de

componentes divididos que involucran la separación de genes virales esenciales del *cis*-Las secuencias reguladoras han reducido las posibilidades de recombinación y posterior removilización de partículas virales. No obstante, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) requiere que todos los productos terapéuticos creados mediante transducción lentiviral se sometan a pruebas exhaustivas para detectar la presencia de virus con capacidad de replicación. Más recientemente, los vectores lentivirales híbridos derivados de lentivirus no humanos (simio, equino, felino, caprino y bovino) se están considerando como alternativas potencialmente más seguras ya que sus virus parentales son patogénicos en humanos, pero cuando se optimizan pueden transducir eficientemente células humanas.

La producción de células T modificadas con CAR por vectores lentivirales es similar a la de los vectores retrovirales gamma en ciertos aspectos. Una construcción de empaquetamiento condicional que expresa *gag-pol* se transfectan con el vector plásmido que lleva el transgén CAR junto con las construcciones de empaquetamiento. El procesamiento del sobrenadante del vector corriente abajo puede requerir ultra centrifugación, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel para producir un sobrenadante lentiviral de alto título. Las células T en reposo son refractarias a la transducción de lentivirus y necesitan ser estimuladas para entrar en la fase G 1b del ciclo celular. Una vez más, los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 pueden usarse para sacar a las células T de su estado G 0 y hacerlas susceptibles a la transducción lentiviral. La transducción productiva y la integración del genoma permiten una expresión estable del transgén CAR en las células T. Las células CART generadas por lentivirales que se dirigen al antígeno CD19 han demostrado una notable eficacia antitumoral en ensayos clínicos (Sauter et al 2019).

La genotoxicidad y la inmunogenicidad relativa de los vectores lentivirales en un modelo de ratón propenso a tumores. Utilizando la administración sistémica en ratones knockout para *Cdkn2a*, demostraron que los vectores SIN inducían significativamente menos eventos oncogénicos impulsados por la activación de oncogén mediada por potenciadores en comparación con los vectores con regiones LTR de tipo salvaje (Biffi et al 2011). También mostraron que la tasa de

eventos oncogénicos asociados con los vectores SIN correlacionadas con la fuerza del promotor interno utilizado, lo que sugiere que los vectores SIN aún pueden inducir la activación de oncogenes dependiendo del diseño del promotor interno. Esta activación podría reducirse aún más mediante la inclusión de aislantes de cromatina sintéticos dentro de la región terminal larga. Estos aislantes funcionan para atenuar la lectura de los promotores internos y reducen significativamente la aparición de eventos de activación oncogénica resultantes de integraciones SIN. Incluso los vectores lentivirales SIN aislados, sin embargo. Estos resultados demuestran la viabilidad de producir vectores lentivirales con menor genotoxicidad, pero muestran que son necesarios mayores niveles de control sobre la integración para eliminar por completo la posibilidad de transformación oncogénica (Ruark, 2018).

Una estrategia para evitar la genotoxicidad asociada con los vectores lentivirales es eliminar por completo la capacidad de integración. Los inconvenientes actuales de estos sistemas de vectores son una menor expresión general del transgén y una pérdida de expresión en las células diana que se dividen rápidamente. La baja expresión del transgén puede compensarse mediante la inclusión de promotores más fuertes. Sin embargo, esto ha demostrado ser difícil de optimizar, ya que estos vectores aún pueden integrarse ilegítimamente en el genoma del huésped (aunque con una frecuencia significativamente menor), donde los promotores fuertes pueden contribuir a eventos oncogénicos. Sin embargo, cuando se prefiere la expresión transitoria del transgén, los vectores deficientes en integración pueden ser particularmente eficaces (Rossi et al 2018).

Estudios recientes han investigado si ciertos vectores y modificaciones de procedimientos pueden aumentar la durabilidad de la expresión transgénica de vectores lentivirales deficientes en integración. Una modificación particular implica la adición de regiones asociadas a la matriz / armazón del locus de interferón β humano a un vector lentivírico no integrante. Los elementos S / MAR pueden funcionar para reclutar factores celulares del huésped en los episomas virales para promover la replicación y la estabilidad mitótica demostraron que los vectores lentivirales no integrantes que contienen estos elementos pueden

generar una expresión transgénica significativa que persiste clonalmente durante más de 100 divisiones celulares *in vivo* (Verghese et al 2014).

Los vectores lentivirales no integrantes también han demostrado ser prometedores para impulsar la expresión de tecnologías como los sistemas de integración dirigidos al sitio (nucleasa de zinc). Múltiples grupos, por ejemplo, han demostrado el uso de vectores lentivirales deficientes en integración para administrar nucleasas con dedos de zinc y ADN molde para inducir eventos de integración dirigidos mediados por zinc. Estos estudios demostraron la integración del transgén dirigido en el genoma del huésped, así como una ventaja en la viabilidad en comparación con los métodos de electroporación actuales que se utilizan con frecuencia para introducirlos basados en plásmidos. El inconveniente de estos sistemas en la actualidad es una eficacia relativamente baja de la integración del transgén en las células primarias del linaje hematopoyético. Se demostró que esto es el resultado de una cantidad de transcripción de ZFN significativamente menor por número de copias de vector en estos tipos de células primarias, lo que sugiere que la optimización de la expresión probablemente aumentará la eficiencia de integración (Lana et al 2020).

8.2.5.1.2 VECTORES RETROVIRALES

Si bien los gamma retrovirus son las plataformas de vectores virales más ampliamente utilizadas para la modificación genética de las células T, se han desarrollado otras plataformas virales para introducir material genético en las células diana. Una vez que dicha plataforma de vector viral en el desarrollo preclínico utiliza alfa retrovirus, un género de la familia *Retroviridae* que incluye el virus del sarcoma de Rous antes mencionado. Un sistema de administración de genes basado en retrovirus alfa tiene varias ventajas potenciales sobre otros vectores basados en retrovirus. En primer lugar, los alfa retrovirus muestran un patrón de integración más aleatorio y neutro en comparación con otros retrovirus, sin enriquecimiento detectable en genes o sitios de inicio de la transcripción. Además, este sistema de vector está desprovisto de elementos de empalme viral, y el sistema de empaquetamiento dividido contiene una superposición de

secuencia significativamente reducida entre plásmidos virales y empaquetadores (en comparación con otros sistemas de vector retroviroico), reduciendo en gran medida el potencial de desarrollo de virus competentes para la replicación (Moco et al 2018).

8.2.5.1.2.1 VECTORES ALFA RETROVIRALES

Estos vectores particularmente en comparación con los vectores lentivirales, tienen la capacidad de fabricar líneas celulares productoras estables. El uso de líneas celulares productoras reduce significativamente las posibilidades de eventos de recombinación en comparación con la producción de virus transitoria, y también proporciona las ventajas económicas de una producción de virus a gran escala consistente y robusta. El establecimiento de sistemas similares con vectores lentivirales ha demostrado ser un desafío debido al silenciamiento a largo plazo de los componentes lentivirales estructurales en las líneas celulares productoras. Las ventajas de los vectores retrovirales alfa aún no se han probado en un entorno clínico, pero parecen ser una alternativa intrigante y potencialmente más segura que los vectores de terapia génica retrovirales utilizados actualmente (Rossi et al 2018).

8.2.5.1.2.2 VECTORES GAMMA RETROVIRALES

Los vectores gamma retrovirales se usan comúnmente en aplicaciones de terapia génica debido a su capacidad para lograr altas tasas de transducción y una expresión transgénica significativa que persiste en el tiempo. La seguridad de los vectores gamma retrovirales también se está controlando cuidadosamente, especialmente a la luz de los eventos adversos asociados con la mutagénesis de inserción en ensayos dirigidos a las células madre hematopoyéticas para la inmunodeficiencia humana grave. Los estudios de análisis de todo el genoma han demostrado que los retrovirus gamma se integran preferentemente cerca de los sitios de inicio de la transcripción y las islas CpG, y que este perfil de integración preferencial aumenta las posibilidades de transformación oncogénica en comparación con un perfil de integración más aleatorio. Este potencial de activación oncogénica puede ser causado por varios mecanismos, incluida la inserción del promotor, la activación del promotor y el truncamiento de la transcripción de genes.

8.2.5.1.3 VECTORES ADENOVIRALES

Los vectores Adenovirus se clasifican generalmente en tres grupos de una manera que depende de qué genes Ad se eliminan en el desarrollo del vector. La mayoría de los vectores de Ad en uso se derivan de virus cuya replicación es defectuosa por delección de la región E1 (vectores de primera generación). La región E1 codifica las proteínas E1A y E1B, que tienen una variedad de funciones en el ciclo de vida viral y son las proteínas transformadoras primarias del virus (Lichtenstein 2004).

Los vectores de segunda generación requieren una función auxiliar, normalmente proporcionada por una línea celular que expresa de forma estable el producto o los productos del gen o los genes Ad suprimidos para la complementación de la producción y el crecimiento del vector. La construcción y selección de líneas celulares complementarias puede llevar mucho tiempo y los vectores de segunda generación inducen niveles reducidos de inflamación en relación con los vectores de primera generación en al menos algunas circunstancias y son más prometedores como agentes de terapia génica y para comprender los mecanismos por los que los vectores adenovirales inducen e inhiben la inflamación sistémica.

8.2.6 EDICIÓN DEL GENOMA

Las herramientas de ingeniería del genoma, en particular, la edición de genes basada en CRISPR / Cas9, representan un campo en evolución para las terapias basadas en CAR, lo que permite una intervención eficiente de secuencia específica en células humanas. La tecnología CRISPR / Cas9 permite la alteración genómica específica de múltiples loci de genes. Se aplicó el sistema CRISPR / Cas9 combinado con una matriz de reparación de vector de virus adenoasociado (AAV) para la integración del ADN que codifica CAR en el locus de la constante α del receptor de células T (TRAC) provocando una expresión uniforme del CAR, una mejora de Potencia de las células T e inhibición de la diferenciación de las células T y del agotamiento. Además, se informó que la edición del genoma mediada por CRISPR / Cas9 y la transducción lentiviral se aplicaron para producir células CART específicas de CD19 deficientes en PD-1,

lo que condujo a una mayor eficacia antitumoral y terapéutica. Aunque los múltiples desafíos, incluida la eficiencia, la seguridad y la escalabilidad, son motivo de preocupación, la terapia con células inmunológicas de genes mejorados con CRISPR / Cas9 podría mejorar aún más las terapias con células CART. Sin embargo, no se aprovecha todo el potencial de la edición del genoma en el contexto de la inmunoterapia basada en células CART y debe examinarse más a fondo en estudios clínicos en humanos (Sun et al 2016).

La tecnología de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas / nucleasa asociada a CRISPR9 (CRISPR / Cas9), un sistema inmunológico adquirido en bacterias y arqueas, ha proporcionado una nueva herramienta para la edición precisa del genoma. El uso de una sola proteína nucleasa en un complejo con 2 ARN cortos como endonucleasa de sitio específico lo convirtió en una herramienta de edición del genoma simple y flexible para apuntar a casi cualquier locus genómico, en particular la terapia con células CAR-T, se convirtió en un campo en rápido crecimiento. En la terapia del cáncer y recientemente Kymriah y Yescarta (células CAR-T dirigidas por CD19) fueron aprobadas por la FDA. Por lo tanto, la combinación de la tecnología CRISPR / Cas9 como herramienta de ingeniería del genoma y la terapia con células CAR-T (células T diseñadas que expresan receptores de antígenos quiméricos) puede conducir a una mejora adicional en la eficiencia y seguridad de las células CAR-T. Este artículo revisa el mecanismo y la aplicación terapéutica de la tecnología CRISPR / Cas9, la precisión de esta tecnología, la inmunoterapia del cáncer por células CAR T, la aplicación de la tecnología CRISPR para la producción de células CAR T universales ha mejorado su eficacia antitumoral para terapia con células CAR-T (Sterner et al 2019).

8.2.7 EXPANSIÓN DE CÉLULAS T

Durante la expansión de las células CART, el número de células aumenta continuamente, por lo que el volumen de medio de cultivo tiene que modificarse mediante más o mayores matraces o placas de cultivo de tejidos. Esto complica enormemente el proceso de fabricación y no es compatible con la producción a gran escala. Por tanto, se han desarrollado bolsas de cultivo estáticas que

permiten una manipulación abierta menos manual, ya que la conexión por tubos se puede realizar en condiciones estériles (Vormittag, 2018).

Además del vector CAR y la estrategia de activación de células T, la estimulación *ex vivo* con citocinas de cadena γ y suplementadas durante el proceso de producción de células CART es otro factor importante que influye en la composición, calidad y fenotipo del producto final de células CART. Los receptores para las citocinas de la familia de la cadena γ , como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, tienen una cadena γ o CD132 común. Las dos estrategias más comúnmente utilizadas para la producción de células CART se basan en IL-2 o IL-7, con o sin IL-15. Hasta ahora, la IL-2 se utilizó principalmente para la expansión de células T en estudios clínicos previos. Por ejemplo, IL-2 se complementa para la producción de *Yescarta*® (*Axicabtagene Ciloleuce*) (Locke et al 2019). Sin embargo, la expansión de células T *ex vivo* en presencia de IL-2 puede conducir a un fenotipo más diferenciado y agotado y puede reducir la persistencia de las células T. Se demostró que la expansión con IL-7 / IL-15 mejora la activación y la proliferación en comparación con IL-2. Además, se informó que una combinación de IL-7 / IL-15 promueve la supervivencia y el mantenimiento de las células T menos diferenciadas, como las células T N y las células T con alta expresión de CD62L y CCR7. Se informó que la suplementación de IL-15 sola puede conducir a una expresión reducida del marcador de agotamiento, un aumento de las propiedades antiapoptóticas, una proliferación mejorada y la preservación de un fenotipo T SCM en comparación con IL-2.

Además, la IL-15 indujo una reducción de la actividad de mTORC1, una disminución de la expresión de la enzima glucolítica y una mejora de la aptitud mitocondrial, lo que condujo a la prevención de la diferenciación de las células T (Mitsuyasu, 2006).

En la transferencia de células adoptivas, IL-21 puede suprimir la diferenciación inducida por antígenos de células T CD8+, mientras que IL-2 e IL-15 mejoran la diferenciación en células T, además, IL-21 medió una mayor expresión de CD62L en comparación con IL-2 e IL-15, así como una mayor actividad antitumoral. La

transferencia adoptiva de células CART específicas de CD19 estimuladas por IL-21 dio como resultado un mayor control de las neoplasias malignas de células B en modelos preclínicos (Shing et al 2011).

En resumen, la suplementación de citocinas durante la expansión ex vivo de las células CART es esencial e indispensable para los protocolos de fabricación de células CART. Los estudios actuales se basan principalmente en IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21. La composición óptima de citocinas, así como el papel de otras citocinas para la generación de células CART, aún no está claramente definida.

8.2.8 CRIOPRESERVACIÓN

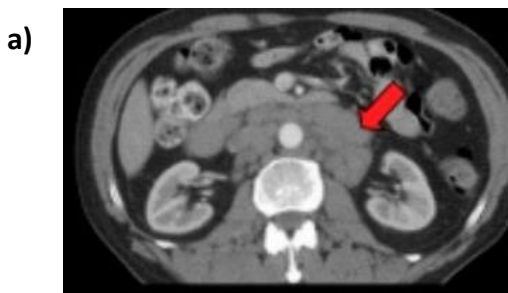
La criopreservación de las células CART al final de la producción es obligatoria para las pruebas de control de calidad en la mayoría de los enfoques de terapia celular CART aplicados actualmente y permite el transporte del producto final desde los sitios de fabricación hasta los centros clínicos. Además, la administración del producto es más flexible y los pacientes posiblemente podrían recibir múltiples tratamientos con células CART. Se informó que la criopreservación de las células CART durante un máximo de 90 días no obstaculizó la viabilidad, la recuperación y la eficacia de la transferencia génica de las células CART criopreservadas (Dull 2015) Aunque la funcionalidad de las células CART criopreservadas directamente después de la descongelación se redujo, una incubación durante la noche a 37 ° C condujo a la recuperación del duro proceso de congelación-descongelación con la funcionalidad restaurada de las células CART. Además, las células CART que se han criopreservado y descongelado inmediatamente antes de la transfusión mostraron una persistencia y eficacia in vivo similares a las de las células CART frescas (Naldinni, 2009).

8.5.6 CARTS APROBADOS POR LA FDA Y LA EMA

El primer tratamiento de células CAR-T aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), en agosto de 2017, es tisagenlecleucel. Está indicado en pacientes de hasta 25 años con leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B refractaria o en segunda o

posterior recidiva. También tiene indicaciones en pacientes adultos con linfoma de células B grandes en recaída o refractario después de dos o más líneas de terapia sistémica, incluido el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) no especificado, linfoma de células B de alto grado y DLBCL que surge de folicular. linfoma El segundo tratamiento de células CAR-T aprobado por la FDA de EE. UU., en octubre de 2017, es axicabtagene ciloleucel, que está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células B grandes en recaída o refractario después de dos o más líneas de terapia sistémica, incluido DLBCL no especificado, linfoma de células B grandes del mediastino primario, linfoma de células B de alto grado y DLBCL que surge del linfoma folicular (Chen et al 2021). Los síndromes linfoproliferativos y las neoplasias hematológicas constituyen un conjunto de patologías altamente heterogéneo, de difícil clasificación, entre las que se incluyen una vasta mayoría de los ya mencionados linfomas no hodgkins, las leucemias linfoblásticas agudas B y la linfocítica crónica B (Griffioen et al 2009).

Se estima que este grupo de enfermedades tienen una incidencia de 15 a 25 casos por cada 100.000 habitantes al año y comparten la característica de expresar de forma muy generalizada el marcador CD19, que al parecer constituye un marcador bastante importante para la supervivencia celular y proliferación de las células malignas y que por lo tanto la represión de su expresión suele ser rara constituyendo una excelente diana para la inmunoterapia con CARTs, pues pese a estar también expresado de forma extendida a lo largo del linaje B, su eliminación puede ser médicamente controlada para que no resulte un peligro para la vida del paciente (Kochenderfer et al 2012).



c)



Figura 13, Tomografías computarizadas del paciente 7 del ensayo clínico descrito, mostraron una adenopatía extensa en la imagen A antes del tratamiento, en la imagen B se observó que después de la infusión la adenopatía retrocedió en el día 32 y por último en la imagen C los ganglios linfáticos agrandados continuaron retrocediendo sustancialmente entre 32 y 132 días después de la infusión de células T. (Imagen modificada de Kochenderfer et al 2012)

Actualmente existen en todo el mundo estudios que sustentan y han documentado la seguridad y eficiencia de las terapias CART, uno de los primeros ensayos que superaron la fase preclínica (Kochenderfer, 2010) y hasta el momento, varios centros de medicina interna y pediátrica han sido certificados para el tratamiento con terapias de células T con CAR que están asociadas con considerables esfuerzos logísticos y de infraestructura adicionales (Vucinic, 2021).

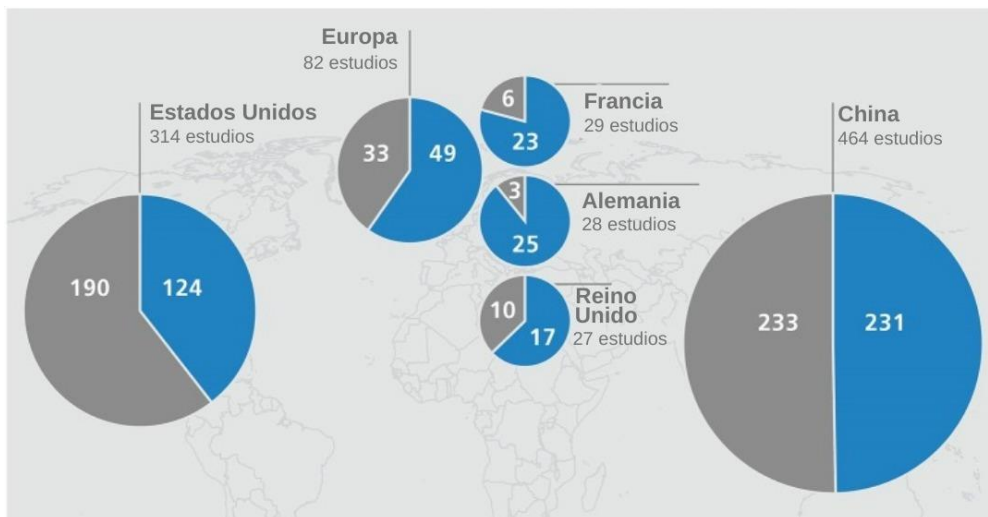


Figura 14. Estadísticas de estudios actuales de Terapia CART en el mundo, financiados por sector industrial y público en gris, (Imagen modificada de Vucinic 2021)

Las terapias autorizadas Tisagenlecleucel y Axicabtagén ciloleucel fueron las primeras en ser respaldadas por el plan PRIME (PRiority Medicines) que apoya el desarrollo de medicamentos indicados para una patología sin tratamiento, los dos receptores de antígeno quiméricos (CAR) de células T terapias fueron aprobados con los nombres comerciales Kymriah™ (tisagenlecleucel) para el tratamiento de pacientes pediátricos y adultos jóvenes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) precursora de células B refractaria o recidivante y Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel) para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células grandes B, ambos son células T autólogas modificadas genéticamente, expresan un CAR específico de CD19, lisan dianas positivas para CD19 (células de linaje B normales y malignas). (FDA 2017) y su diferencia está en los vectores utilizados, lentivirales para Kymriah™ y Y- retrovirales para Yescarta™ con una tasa de respuesta fue del 83% según datos reportados de múltiples ensayos clínicos y numerosos informes han destacado dramáticamente el potencial de salvar vidas de Kymriah™ y Yescarta™, y se han acuñado como “drogas vivas” y las especificaciones de los fármacos están descritos en la figura 15. (Novartis, 2017).

Durante los ensayos se observaron algunos efectos secundarios asociados a síndrome de liberación de citocinas sin embargo, algunos de los protocolos utilizan fármacos profilácticos como acetaminofén o difenhidramina vía intravenosa para prevenir y evitar las toxicidades fatales y potencialmente mortales, además de hacer énfasis en la capacitación obligatoria, monitoreo cuidadoso y regulación tanto del personal como del lugar donde se realiza la terapia, para la detección temprana y el tratamiento de complicaciones posterior a la infusión que requieren vigilancia hospitalaria durante los 7 días posteriores de iniciado el tratamiento (Bouchkouj et al 2019).

La eficacia de la terapia con células CAR T se basa no solo en las funciones antitumorales de las células CAR T, sino también en su expansión y persistencia *in vivo*, por lo tanto, la identificación de la composición celular óptima sigue siendo un área crucial de investigación. En la gran mayoría de los ensayos de células T con CAR CD19, los pacientes recibieron células T con CAR autólogas, sin embargo, las investigaciones actuales se basan en la mejora y vías alternas

que puedan hacer más eficiente la terapia, usando transferencia génica no viral, o usando células alogénicas de donantes para mediar la remisión de la malignidad sin causar rechazo de injerto contrahuésped y garantizar una producción confiable de las células CAR T "listas para usar" generadas a partir de donantes sanos (Magalhaes et al 2020).

Kymriah

- **Vía de administración:** intravenosa
 - **Almacenamiento:** bolsa de perfusión de etilvinilacetato (EVA) de Kymriah contiene células de tisagenlecleucel
 - **Composición cualitativa:** células autólogas genéticamente modificadas que expresan un receptor de antígeno quimérico anti-CD19
 - **Composición cuantitativa:** Cada bolsa contienen un total de $1,2 \times 10^6$ a 6×10^8 de células T CAR positivas viables.
 - **Forma Farmacéutica:** Dispersión para perfusión, incolora ligeramente amarillenta.
- **Posología:**
Pacientes pediátricos y adultos jóvenes
50 kg o menos: $0,2$ a $5,0 \times 10^6$ de células T CAR-positivas viables/kg de peso corporal y paciente de más de 50 kg: $0,1$ a $2,5 \times 10^8$ de células T CAR-positivas viables (no basado en el peso)
Pacientes adultos: $0,6$ a 6×10^8 células T CAR-positivas viables (no basado en el peso).
- **Indicaciones:** LLA de células B, LBDC

Yescarta

- **Vía de administración:** intravenosa
 - **Almacenamiento:** bolsa de perfusión de etilvinilacetato (EVA)
 - **Composición cualitativa:** células autólogas genéticamente modificadas que expresan un receptor de antígeno quimérico anti-CD19
 - **Composición cuantitativa:** Una dosis única de 68 ml en una bolsa de perfusión de Yescarta contiene 2×10^6 células T CAR positivas viables por kg de peso corporal
 - **Forma Farmacéutica:** Dispersión para perfusión, transparente a opaca, de color blanca a roja
- **Posología:** 2×10^6 células T CAR positivas viables por kg de peso corporal (o un máximo de 2×10^8 células T CAR positivas viables para pacientes que pesen 100 kg o más)
- **Indicaciones:** LBDCG, LBPM y LBDCG derivado de linfoma folicular

Figura 15 Descripción de fichas técnicas de cada uno de los CART autorizados por FDA y EMA, información obtenida de EMA y Novartis.

10.DISCUSIÓN

La inmunoterapia de células adaptadas, que utiliza células CAR-T autólogas, es una terapia emergente en tumores sólidos y cánceres hematológicos, que combina la especificidad de los anticuerpos monoclonales con la potente citotoxicidad, el potencial de expansión y la persistencia a largo plazo de los linfocitos T citotóxicos, por medio de ésta revisión de artículos que describen la eficacia y la seguridad de la terapia con células CAR-T autorizados por la FDA y la EMA, se observó una elevada efectividad, para pacientes con neoplasias malignas hematológicas, y una variabilidad significativa más baja entre los estudios de terapia de células CAR-T no dirigidas a CD19 y tumores sólidos.

Se observó una heterogeneidad para el resultado de respuesta completa entre los estudios combinados de terapia de células CAR-T dirigidas a CD19, en particular, los pacientes con LLA de cáncer hematológico, con una respuesta significativamente mayor en comparación con los pacientes con leucemia linfocítica crónica.

En los resultados obtenidos de diferentes estudios que llegaron a fase clínica, se demostró que la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a CD19 es un revolucionario pilar para el tratamiento de varios tipos de cáncer hematológico, sus respuestas clínicas han sido notables especialmente para ciertos subconjuntos de leucemia o linfoma de células B, esta terapia pudo desarrollarse y aprobarse, gracias al estudio e identificación de antígenos sobre expresados en las células tumorales para el diseño y modificación genética de los Linfocitos T citotóxicos, por medio de vectores virales, obteniendo resultados clínicos preliminares y preclínicos exitosos, con la capacidad de reconocimiento específico de los antígenos diana, amplia aplicabilidad para pacientes resistentes a terapias convencionales, capacidad para eludir el "escape del tumor", y administración rápida de una población de linfocitos T específicos del tumor con células autólogas.

Se describen múltiples desafíos por resolver para el mejor manejo de las barreras y limitaciones que incluyen toxicidades, actividad antitumoral modesta para algunos tumores sólidos, escape de antígenos, tráfico restringido e infiltración tumoral limitada y, el más reportado, el síndrome de liberación de citoquinas y la neurotoxicidad entre los estudios de cáncer hematológico. Estos son efectos secundarios únicos y a menudo graves, sin embargo, los estudios no proporcionaron una clasificación sobre la gravedad de los eventos, únicamente refería algunos los métodos profilácticos utilizados por medio de antipiréticos o esteroides en bajas dosis, para la limitación de los efectos secundarios y asociándose más bien a la eficacia limitada que provocan estos eventos.

Los resultados observados respaldan los tratamientos aprobados actualmente y también identifican las lagunas de conocimiento que se pueden estudiar e investigar para diferentes tipos de cáncer, la oportunidad de investigación sobre nuevos antígenos para aplicación de terapias de células adaptadas en tumores sólidos, usando el fundamento biológico de la inmunoterapia CART, representa una amplia área de estudio, buscando resolver las complicaciones actualmente descritas para evitar los efectos secundarios así como la mejora del método de transferencia de genes por medio de adenovirus, retrovirus y lentivirus porque a pesar de que estos vectores pueden ser manipulados de forma relativamente fácil como virus no replicativos y producidos en grandes cantidades; su limitada capacidad para incluir transgenes grandes y su inmunogenicidad presentan inconvenientes en su aplicación terapéutica, pues al infectar humanos de forma natural generan respuestas inmunológicas neutralizando su eficacia y en el caso de los vectores retrovirales debido a la capacidad semi-aleatoria de su integración, que puede causar genotoxicidad, mientras que los vectores lentivirales reducen la posibilidad de efectos mutagénicos.

Se han considerado nuevas alternativas para la recombinación genética que permitan la expresión de los receptores quiméricos en la superficie de las células T, lo que puede disminuir el riesgo de mutagénesis, por lo que las expectativas completas de las células CAR T se cumplirá plenamente cuando se optimicen la gestión de la toxicidad y la eficacia, después de probar diferentes niveles de

dosis y programas, se puede concluir que los esquemas de dosificación fraccionada que utiliza puede permitir una respuesta adaptativa y maximiza la seguridad al tiempo que conserva la eficacia, lo que permanece en estudio, ya que la posología de las terapias autorizadas no hacen referencia a esta opción para el tratamiento y seguimiento de los pacientes.

Otra observación importante fue la descripción de la efectividad y viabilidad de los estudios han demostrado que los CARs de diferentes generaciones, explicando que los de primera generación se activan en ausencia de una segunda señal pero generalmente sufrían apoptosis y no lograban una proliferación suficiente para poder llegar a fases II de ensayos clínicos, comparado con los CAR T de segunda y tercera generación que ahora se encuentran aprobadas abiertamente y porque los receptores de cuarta generación se encuentran en desarrollo para tratamientos de tumores sólidos por medio de administración intratumoral e intracavitaria.

El desarrollo de esta tecnología contra los antígenos CD19, CD20, CD22, CD30 y CD138 ha revolucionado el tratamiento de neoplasias hematológicas recurrentes como linfoma Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica B (LLC) y mieloma múltiple, que son los tipos de cáncer más sensibles a esta terapia, la tasa de éxito de esta terapia está directamente relacionada con la preparación previa del paciente, que aunque no está completamente estandarizada según las revisiones de ensayos clínicos que se utilizaron como base para desarrollar esta investigación la linfodepleción ha jugado un papel sumamente importante en el momento de aplicar la terapia. En estos casos, la quimioterapia suele ser el estándar de tratamiento, seguido de una aplicación, aunque para ello se debe alcanzar un estado clínico con enfermedad residual mínima negativa.

La precisión con la cual las células T han sido diseñadas para reconocer el tumor, ciertamente reduce el riesgo de efectos adversos generales como el observado en las quimioterapias convencionales, sin embargo, algunos de los estudios han reportado fenómenos de toxicidad con un rango de intensidad variable, mediado por las propias células inmunológicas transferidas. Algunos ejemplos son el

síndrome de liberación de citoquinas (SLC) proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF e IFN- γ , provocado por la activación masiva de los linfocitos T que puede llevar a la caída de la presión arterial y complicaciones neurológicas y el síndrome de lisis del tumor que desencadena una serie de complicaciones metabólicas que pueden llevar a la falla renal aguda, derivada de la liberación masiva de potasio, fosfato y ácidos nucleicos a causa de la muerte tumoral por lo que se el protocolo para preguntarnos si las estrategias de mitigación, incluido un esquema de dosificación fraccionada, podrían mantener altas tasas de respuesta con una tolerabilidad aceptable en pacientes adultos con LLA.

Los casos de éxito de los CARs en los ensayos clínicos llevaron a la aprobación de la FDA para uso clínico dentro de los cuales encontramos nombre como Tisagenlecleucel, decabtagene vicleucel y lisocabtagene maraleucel, generados por medio de ingeniería genética y usando vectores virales como transportadores que permite introducir el material genético de interés en el paciente durante la evolución, y logrando para la preservación prolongada de su propio material genético generando procesos de supresión o modificación de mecanismos protectores en el organismo huésped, sin poner el riesgo al paciente.

Los estudios en el área de la inmunooncología dirigidos a terapia CART se han dirigido en la mejora de la bioseguridad y función de células para evitar y prevenir las distintas complicaciones suscitadas por la actividad de las células T-CAR e impulsar la seguridad de la terapia, por medio de un esquema de dosificación fraccionada que permita una dosificación adaptativa en la que solo los pacientes con mayor probabilidad de responder, recibirá esta dosis más baja, es posible que tuvieran una toxicidad más severa, y nuestra estrategia potencialmente mitiga esto. Y se observó que los pacientes que no tenían tormenta de citocinas temprana recibieron una serie de dosificaciones y no experimentaron toxicidad excesiva relacionada con síndrome de liberación de citocinas, por el contrario, los pacientes que recibieron dosis únicas y altas, si tuvieron presentaciones toxicas severas, lo que resulto en efectos tóxicos multisistémicos en algunos ensayos.

Se ha determinado en diversos estudios que un alto porcentaje de los pacientes que logra acceder a esta terapia, ha logrado una remisión completa, y un 85% y 70% de supervivencia a 5 años en pacientes pediátricos y adultos, respectivamente, sin embargo, aquellos pacientes con enfermedad resistente a quimioterapéuticos y radiación por tiempos prolongados tienen un pronóstico menos favorable con respecto a los que han mostrado una respuesta favorable a los tratamientos, en los ensayos clínicos de fase II se han observado regresiones importantes con un 90% de respuestas completas o enfermedad residual mínima y definitivamente el resultado más estudiado y comprobado ha sido en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda utilizando un CAR contra la molécula CD19 con receptores de segunda y tercera generación.

A pesar de su sólida eficacia terapéutica, las terapias CAR-T actuales están asociadas a múltiples limitantes como lo ha sido el síndrome de liberación de citocinas y los altos costos, ya que los precios de lista de Kymriah y Yescarta son \$ 475,000 y \$ 373,000, respectivamente, lo que para nuestro país supone un impedimento debido a la carga financiera que imponen a los pacientes, o a las instituciones que pudieran desarrollar la terapia, ya que el costo de producción del vector viral recombinantes por lo que se han optado por alternativas no virales que pueden reducir los costos de producción con plásmidos de ADN, sin embargo, aún no se encuentra aprobado por la FDA ni la EMA

Las tasas de respuesta altas y duraderas observadas con el tratamiento CAR-T son prometedoras, sin embargo, debe tenerse en cuenta que los estudios revisados reportan seguimientos a corto plazo y el potencial de efectos tóxicos a largo plazo requiere un análisis más detallado, para poder trasladar estos resultados a tumores sólidos más agresivos aparentemente incurables, usando como modelo los resultados observados en tumores.

El conocimiento de la respuesta inmune ha permitido comprender los mecanismos que permiten a nuestro sistema inmune luchar contra las neoplasias, así como aquellos que podrían fallar e incluso ser usados por el tumor a su favor, pese a esto, aún queda mucho por descubrir y los conocimientos acumulados en este campo hasta la fecha nos han permitido

desarrollar una amplia gama de estrategias posibles que pueden ser adoptadas potencialmente, si bien informes recientes han demostrado el éxito de esta tecnología en neoplasias malignas hematológicas, la aplicación de esta terapia a neoplasias malignas sólidas puede necesitar un mayor desarrollo, ya que las primeras investigaciones se han centrado en la capacidad de generar de manera confiable células T dirigidas al tumor, es posible que las células T modificadas con CAR se vuelvan ineficaces al ingresar al microambiente tumoral supresor, por lo tanto, el futuro de esta terapia está en la generación de células T modificadas con CAR que resistirán la apoptosis que se produce para todos los efectores inmunitarios dentro del microambiente tumoral.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La comprensión del proceso de construcción y administración de la terapia de células T adaptadas con receptores de antígeno quimérico, representa un área de oportunidad de investigación, por la vasta información al alcance para identificar nuevas estrategias de desarrollo y la mejora de los resultados con el fin de ofrecer nuevas aplicaciones que ofrezcan una terapia con mayor seguridad y eficiencia, de manera que la medicina personalizada se encuentre al alcance de más personas en nuestro contexto social y actual.

La inmunología y la oncología tienen una larga relación, tanto en términos evolutivos como dentro de las ciencias biomédicas, es así que la medicina personalizada contra el cáncer es una estrategia prometedora para tratar enfermedades de forma muy precisa, que funciona estimulando el sistema inmunológico para apuntar y atacar específicamente blancos celulares y moleculares, podemos concluir que la terapia CAR-T es una estrategia basada en la modificación de linfocitos T celular mediante la administración de ácidos nucleicos y destinada para el tratamiento del cáncer, su eficiencia ha sido comprobada únicamente en neoplasias hematológicas, pero hoy en día se sigue buscando la forma de adaptar estos tratamientos a neoplasia sólidas que puedan ofrecer a los pacientes oportunidades de recuperación sin menos secuelas y con un riesgo de remisión bajo durante varios años.

En nuestro contexto social resulta una terapia poco viable por el proceso de ingeniería genética que no es costeable para instituciones públicas y privadas, para los investigadores del área en nuestro país, el costeo resulta complicado, por el trabajo interdisciplinario que requieren los ensayos clínicos y el diseño experimental de los mismos, sin embargo, si el desarrollo de los receptores CART se pudiera realizar por métodos de biología molecular menos costosos que no requieran el uso de vectores virales recombinantes, la posibilidad de uso, abriría una nueva área de tratamiento real para pacientes con cáncer hematológico, que cobra tantas vidas en nuestro país, otra limitante importante es que el desarrollo de CARTs dirigidos contra tumores sólidos no se encuentra tan avanzado como el de las neoplasias líquidas, a pesar de existir terapias intracavitarias e intratumorales, con ensayos clínicos de Fase I para neuroblastoma, glioblastoma y gliomas malignos con evidencia modesta de su efectividad terapéutica, pero se espera que los CART de cuarta generación sean la mejor oportunidad para ofrecer una alternativa confiable y sin riesgos de toxicidad.

Por último, con esta revisión se describieron las principales cualidades documentadas de una inmunoterapia tumoral exitosa utilizando células T modificadas con receptor de antígeno quimérico, donde hasta ahora se ha observado que el antígeno diana, el dominio de señalización, la proliferación, la persistencia, la función retenida, el estado de la enfermedad del paciente y el régimen de acondicionamiento han sido determinantes de importancia crítica, para la medir la eficiencia terapéutica, determinando como conclusión que el futuro de estas inmunoterapias está en el desarrollo de células T diana tumorales, su optimización y mejora de la modificación genética para que las células modificadas, puedan superar el microambiente tumoral hostil y estimular de una forma adecuada una respuesta antitumoral endógena, sin los efectos secundarios que ponen en riesgo todo el procedimiento.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abramson, J. S., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D. G., Andreadis, C., Sehgal, A., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Garcia, J., Kostic, A., Mallaney, M., Ogasawara, K., Newhall, K., Kim, Y., ... Siddiqi, T. (2020). Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet (London, England)*, 396(10254), 839–852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0)

Allen, E. S., Stroncek, D. F., Ren, J., Eder, A. F., West, K. A., Fry, T. J., Lee, D. W., Mackall, C. L., & Conry-Cantilena, C. (2017). Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion*, 57(5), 1133–1141. <https://doi.org/10.1111/trf.14003>

An, F., Wang, H., Liu, Z., Wu, F., Zhang, J., Tao, Q., Li, Y., Shen, Y., Ruan, Y., Zhang, Q., Pan, Y., Zhu, W., Qin, H., Wang, Y., Fu, Y., Feng, Z., & Zhai, Z. (2020). Influence of patient characteristics on chimeric antigen receptor T cell therapy in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature communications*, 11(1), 5928. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19774-x>

Attaf, M., Legut, M., Cole, D. K., & Sewell, A. K. (2015). The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system. *Clinical and experimental immunology*, 181(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/cei.12622>

B. J., Morrison, K., Brenner, M. K., ... Savoldo, B. (2020). Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(32), 3794–3804. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01342>

Bao, F., Wan, W., He, T., Qi, F., Liu, G., Hu, K., Lu, X. A., Yang, P., Dong, F., Wang, J., & Jing, H. (2019). Autologous CD19-directed chimeric antigen receptor-T cell is an effective and safe treatment to refractory or relapsed diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer gene therapy*, 26(7-8), 248–255. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0073-7>

Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G., & Sharpe, A. H. (2016). Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annual review of immunology*, 34, 539–573. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112049>

Bhoj, V. G., Arhontoulis, D., Wertheim, G., Capobianchi, J., Callahan, C. A., Ellebrecht, C. T., Obstfeld, A. E., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Nazimuddin, F., Hwang, W. T., Maude, S. L., Wasik, M. A., Bagg, A., Schuster, S., Feldman, M. D., Porter, D. L., Grupp, S. A., June, C. H., & Milone, M. C. (2016). Persistence of long-lived plasma cells and humoral immunity in individuals responding to CD19-directed CAR T-cell therapy. *Blood*, 128(3), 360–370. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694356>

Biffi, A., Bartolomeo, C. C., Cesana, D., Cartier, N., Aubourg, P., Ranzani, M., ... & Montini, E. (2011). Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(20), 5332-5339.

Botta C, Bestoso E, Apollinari S, Cusi MG, Pastina P, Abbruzzese A, Sperlongano P, Misso G, Caraglia M, Tassone P, Tagliaferri P, Correale P. Immune-modulating effects of the newest cetuximab-based chemoimmunotherapy regimen in advanced colorectal cancer patients. *J Immunother*. 2012 Jun;35(5):440-7. doi: 10.1097/CJI.0b013e31825943aa. PMID: 22576349.

Bouchkouj, N., Kasamon, Y. L., de Claro, R. A., George, B., Lin, X., Lee, S., Blumenthal, G. M., Bryan, W., McKee, A. E., & Pazdur, R. (2019). FDA Approval Summary: Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-cell Lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American*

Association for Cancer Research, 25(6),1702–1708.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2743>

Boyiadzis, M. M., Dhodapkar, M. V., Brentjens, R. J., Kochenderfer, J. N., Neelapu, S. S., Maus, M. V., Porter, D. L., Maloney, D. G., Grupp, S. A., Mackall, C. L., June, C. H., & Bishop, M. R. (2018). Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. *Journal for immunotherapy of cancer*, 6(1), 137.
<https://doi.org/10.1186/s40425-018-0460-5>

Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I. V., Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., Steinherz, P., ... Sadelain, M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine*, 5(177), 177ra38.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005930>

C. H., Giralt, S., Matasar, M. J., Perales, M. A., Curran, K. J., Park, J., Sadelain, M., ... Brentjens, R. J. (2019). CD19 CAR T cells following autologous transplantation in poor-risk relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 134(7),626–635.<https://doi.org/10.1182/blood.2018883421>

Castro J.E., Kipps T.J. (2019) Chimeric Antigen Receptor T Cells: Antigen Selection, CAR Development, and Data in Neoplastic Hematology. In: Perales MA., Abutalib S., Bollard C. (eds) Cell and Gene Therapies. Advances and Controversies in Hematopoietic Transplantation and Cell Therapy. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54368-0_3

Castro, J. E., Melo-Cardenas, J., Urquiza, M., Barajas-Gamboa, J. S., Pakbaz, Cavaletti, G., Nicolini, G., & Marmioli, P. (2008). Neurotoxic effects of antineoplastic drugs: the lesson of pre-clinical studies. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 3506–3524. <https://doi.org/10.2741/2945>

Chene, G., Lamblin, G., Le Bail-Carval, K., Beaufils, E., Chabert, P., Gaucherand, P., Mellier, G., & Coppens, Y. (2016). Le(s) cancer(s) de Lucy: une origine

préhistorique? [Lucy's cancer(s): A prehistorical origin?]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 44(12), 690–700. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2016.10.001>

Chmielewski, M., & Abken, H. (2015). TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert opinion on biological therapy*, 15(8), 1145–1154. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1046430>

Couzin-Frankel J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), 1432–1433. <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>

D. L. Lichtenstein & W. S. Wold: Experimental infections of humans with wild-type adenoviruses and with replication-competent adenovirus vectors: replication, safety, and transmission. *Cancer Gene Ther.* published on line Sept. 10, 1-11 (2004)

Do Minh, A., Tran, M. Y., & Kamen, A. A. (2020). Lentiviral Vector Production in Suspension Culture Using Serum-Free Medium for the Transduction of CAR- T Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2086, 77–83. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0146-4_6

Enblad, G., Karlsson, H., Gammelgård, G., Wenhe, J., Lövgren, T., Amini, R. M., Wikstrom, K. I., Essand, M., Savoldo, B., Hallböök, H., Höglund, M., Dotti, G., Brenner, M. K., Hagberg, H., & Loskog, A. (2018). A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(24),6185–6194. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0426>

Feucht J., Sun J., Eyquem J., Ho Y.J., Zhao Z., Leibold J., Dobrin A., Cabriolu A., Hamieh M., Sadelain M. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nat. Med.* 2019;25:82–88. doi: 10.1038/s41591-018-0290-5.

Fidler, M. M., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2018). The global cancer burden and human development: A review. *Scandinavian journal of public health*, 46(1), 27–36. <https://doi.org/10.1177/1403494817715400>

Filley, A. C., Henriquez, M., & Dey, M. (2018). CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors. *Frontiers in oncology*, 8, 453. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00453>

Finney, O. C., Brakke, H. M., Rawlings-Rhea, S., Hicks, R., Doolittle, D., Lopez, M., Futrell, R. B., Orentas, R. J., Li, D., Gardner, R. A., & Jensen, M. C. (2019). CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *The Journal of clinical investigation*, 129(5), 2123–2132. <https://doi.org/10.1172/JCI125423>

Fraietta J.A., Lacey S.F., Orlando E.J., Pruteanu-Malinici I., Gohil M., Lundh S., Boesteanu A.C., Wang Y., O'Connor R.S., Hwang W.T., et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 2018;24:563–571. doi: 10.1038/s41591-018-0010-1.

Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P., & Domschke, C. (2013). B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*, 2(7), e25443. <https://doi.org/10.4161/onci.25443>

Frey, N. V., Gill, S., Hexner, E. O., Schuster, S., Nasta, S., Loren, A., Svoboda, J., Stadtmauer, E., Landsburg, D. J., Mato, A., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Veloso, E., Gaymon, A., Pequignot, E., Shan, X., Hwang, W. T., June, C. H., & Porter, D. L. (2020). Long-Term Outcomes From a Randomized Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(25), 2862–2871. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03237>

Frey, N. V., Shaw, P. A., Hexner, E. O., Pequignot, E., Gill, S., Luger, S. M., Mangan, J. K., Loren, A. W., Perl, A. E., Maude, S. L., Grupp, S. A., Shah, N. N., Gilmore, J., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Levine, B. L., June, C. H., & Porter, D. L. (2020). Optimizing Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(5), 415–422. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01892>

Fu, M., & Tang, L. (2019). Chimeric Antigen Receptor T Cell Immunotherapy for Tumor: A Review of Patent Literatures. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, *14*(1), 60–69. <https://doi.org/10.2174/1574892814666190111120908>

Galluzzi, L., Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J. M., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J. P., Agostinis, P., Apte, R. N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J. Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., ... Kroemer, G. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, *5*(24), 12472–12508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2998>

Gardner, R. A., Finney, O., Annesley, C., Brakke, H., Summers, C., Leger, K., Bleakley, M., Brown, C., Mgebroff, S., Kelly-Spratt, K. S., Hogg, V., Lindgren, C., Oron, A. P., Li, D., Riddell, S. R., Park, J. R., & Jensen, M. C. (2017). Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*, *129*(25), 3322–3331. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-769208>

Garfall, A. L., Stadtmauer, E. A., Hwang, W. T., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Krevvata, M., Carroll, M. P., Matsui, W. H., Wang, Q., Dhodapkar, M. V., Dhodapkar, K., Das, R., Vogl, D. T., Weiss, B. M., Cohen, A. D., Mangan, P. A., Ayers, E. C., Nunez-Cruz, S., Kulikovskaya, I., Davis, M. M., ... June, C. H. (2018). Anti-CD19 CAR T cells with high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation for refractory multiple myeloma. *JCI insight*, *3*(8), e120505. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120505>

Graham, T. A., & Sottoriva, A. (2017). Measuring cancer evolution from the genome. *The Journal of pathology*, *241*(2), 183–191. <https://doi.org/10.1002/path.4821> Griffioen M, van Egmond E, Kester M, Willemze R, Falkenburg J, Heemskerk M. 42 Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy. *Haematologica*. 2009; *94*(9): p. 1316-1320. 90.

Gu, R., Liu, F., Zou, D., Xu, Y., Lu, Y., Liu, B., Liu, W., Chen, X., Liu, K., Guo, Y., Gong, X., Lv, R., Chen, X., Zhou, C., Zhong, M., Wang, H., Wei, H., Mi, Y., Qiu, L., Lv, L., ... Wang, J. (2020). Efficacy and safety of CD19 CAR T constructed

with a new anti-CD19 chimeric antigen receptor in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00953-8>

Guedan, S., & Alemany, R. (2018). CAR-T Cells and Oncolytic Viruses: Joining Forces to Overcome the Solid Tumor Challenge. *Frontiers in immunology*, 9, 2460. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02460>

Guest, R. D., Kirillova, N., Mowbray, S., Gornall, H., Rothwell, D. G. Cheadle, E. J., Austin, E., Smith, K., Watt, S. M., Kühlcke, K., Westwood, N., Thistlethwaite, F., Hawkins, R. E., & Gilham, D. E. (2014). Definition and application of good manufacturing process-compliant production of CEA- specific chimeric antigen receptor expressing T-cells for phase I/II clinical trial. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 63(2), 133–145. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1492-9>

H. (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Science translational medicine*, 4(132), 132ra53. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003761>

Hamieh M., Dobrin A., Cabriolu A., van der Stegen S.J.C., Giavridis T., Mansilla-Soto J., Eyquem J., Zhao Z., Whitlock B.M., Miele M.M., et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature*. 2019;568:112–116. doi: 10.1038/s41586-019-1054-1.

Han, X., Wang, Y., & Han, W. D. (2018). Chimeric antigen receptor modified T-cells for cancer treatment. *Chronic diseases and translational medicine*, 4(4), 225–243. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.08.002>

Hansen, E., & Read, A. F. (2020). Cancer therapy: Attempt cure or manage drug resistance?. *Evolutionary applications*, 13(7), 1660–1672. <https://doi.org/10.1111/eva.12994>

Hay, K. A., Gauthier, J., Hirayama, A. V., Voutsinas, J. M., Wu, Q., Li, D., Gooley, T. A., Cherian, S., Chen, X., Pender, B. S., Hawkins, R. M., Vakil, A., Steinmetz, R. N., Schoch, G., Chapuis, A. G., Till, B. G., Kiem, H. P., Ramos, J. D., Shadman, M., Cassaday, R. D., ... Turtle, C. J. (2019). Factors associated with

durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD- negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood*, 133(15), 1652–1663. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-883710>

Hiam-Galvez, K. J., Allen, B. M., & Spitzer, M. H. (2021). Systemic immunity in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1–15. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>

Hirayama, A. V., Gauthier, J., Hay, K. A., Voutsinas, J. M., Wu, Q., Pender, B. S., Hawkins, R. M., Vakil, A., Steinmetz, R. N., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2019). High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Blood*, 134(7), 636–640. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000905>

Hirayama, A. V., Gauthier, J., Hay, K. A., Voutsinas, J. M., Wu, Q., Gooley, T., Li, D., Cherian, S., Chen, X., Pender, B. S., Hawkins, R. M., Vakil, A., Steinmetz, R. N., Acharya, U. H., Cassaday, R. D., Chapuis, A. G., Dhawale, T. M., Hendrie, P. C., Kiem, H. P., Lynch, R. C., ... Turtle, C. J. (2019). The response to lymphodepletion impacts PFS in patients with aggressive non- Hodgkin lymphoma treated with CD19 CAR T cells. *Blood*, 133(17), 1876– 1887. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-887067>

J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine*, 371(16), 1507–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222>

Jacoby, E., Bielecki, B., Avigdor, A., Itzhaki, O., Hutt, D., Nussboim, V., Meir, A., Kubi, A., Levy, M., Zikich, D., Zeltzer, L. A., Brezinger, K., Schachter, J., Nagler, A., Besser, M. J., & Toren, A. (2018). Locally produced CD19 CAR T cells leading to clinical remissions in medullary and extramedullary relapsed acute lymphoblastic leukemia. *American journal of hematology*, 93(12), 1485– 1492. <https://doi.org/10.1002/ajh.25274>

Kandalaft, L. E., Powell, D. J., Jr, & Coukos, G. (2012). A phase I clinical trial of adoptive transfer of folate receptor-alpha redirected autologous T cells for recurrent ovarian cancer. *Journal of translational medicine*, 10, 157. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-157>

Kasakovski D., Xu L., Li Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* 2018;11:91. doi: 10.1186/s13045-018-0629-x.

Kawakami Y. (2016). Introduction: Cancer Immunology Special Issue-Immunotherapy. *International immunology*, 28(7), 317. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw028>

Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Wilson, W. H., Spaner, D. E., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., Yang, J. C., Kammula, U. S., Devillier, L., Carpenter, R., Nathan, D. A., Morgan, R. A., Laurencot, C., & Rosenberg, S. A. (2012). B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 119(12), 2709–2720. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384388>

Kochenderfer, J. N., Wilson, W. H., Janik, J. E., Dudley, M. E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D. A., Lanier, B. J., Morgan, R. A., & Rosenberg, S. A. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 116(20), 4099–4102. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281931>

Kossila, M., Jauhiainen, S., Laukkanen, M. O., Lehtolainen, P., Jääskeläinen, M., Turunen, P., ... & Ylä-Herttua, S. (2002). Improvement in Adenoviral Gene Transfer Efficiency after Preincubation at + 37° C in Vitro and in Vivo. *Molecular therapy*, 5(1), 87-93.

Laetsch, T. W., Myers, G. D., Baruchel, A., Dietz, A. C., Pulsipher, M. A., Bittencourt, H., Buechner, J., De Moerloose, B., Davis, K. L., Nemecek, E., Driscoll, T., Mechinaud, F., Boissel, N., Rives, S., Bader, P., Peters, C., Sabnis,

H. S., Grupp, S. A., Yanik, G. A., Hiramatsu, H., ... Harris, A. C. (2019). Patient-reported quality of life after tisagenlecleucel infusion in children and young adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a global, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 20(12), 1710–1718. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30493-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30493-0)

Lamers CH, Willemsen R, Van Elzaker P, Van SteenbergenLangeveld S, Broertjes M, Oosterwijk-Wakka J, Oosterwijk E, Sleijfer S, Debets R, Gratama JW (2011) Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivoengineered T cells. *Blood* 117:72–82

Lapteva, N., Gilbert, M., Diaconu, I., Rollins, L. A., Al-Sabbagh, M., Naik, S., Krance, R. A., Tripic, T., Hiregange, M., Raghavan, D., Dakhova, O., Rouce, R. H., Liu, H., Omer, B., Savoldo, B., Dotti, G., Cruz, C. R., Sharpe, K., Gates, M., Orozco, A., ... Rooney, C. M. (2019). T-Cell Receptor Stimulation Enhances the Expansion and Function of CD19 Chimeric Antigen Receptor- Expressing T Cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(24), 7340–7350. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3199>

Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek D, Tschernia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS, Mackall CL (2015) T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose- escalation trial. *Lancet* 385:517–528

Lee, Y. H., & Kim, C. H. (2019). Evolution of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy: current status and future perspectives. *Archives of pharmacal research*, 42(7), 607–616. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01136-x>

Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ (2011) Cancer immunotherapy– revisited. *Nat Rev Drug Discov* 10:591–600 Liu X, Jiang S, Fang C, Yang S, Olalere D, Pequignot EC, Cogdill AP, Li N, Ramones M, Granda B, Zhou L, Loew A, Young RM, June CH, Zhao Y (2015) Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen

receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice. *Cancer Res* 75:3596–3607

Levy, E. M., Roberti, M. P., & Mordoh, J. (2011). Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 676198. <https://doi.org/10.1155/2011/676198>

Li, S., Zhang, J., Wang, M., Fu, G., Li, Y., Pei, L., Xiong, Z., Qin, D., Zhang, R., Tian, X., Wei, Z., Chen, R., Chen, X., Wan, J., Chen, J., Wei, X., Xu, Y., Zhang, P., Wang, P., Peng, X., ... Qian, C. (2018). Treatment of acute lymphoblastic leukaemia with the second generation of CD19 CAR-T containing either CD28 or 4-1BB. *British journal of haematology*, 181(3), 360–371. <https://doi.org/10.1111/bjh.15195>

Lin, L., Hu, X., Zhang, H., & Hu, H. (2019). Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Immunology: Mechanisms and the New Strategy for Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 10, 1398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01398>

Locke, F. L., Neelapu, S. S., Bartlett, N. L., Siddiqi, T., Chavez, J. C., Hosing, C. M., Ghobadi, A., Budde, L. E., Bot, A., Rossi, J. M., Jiang, Y., Xue, A. X., Elias, M., Aycock, J., Wiezorek, J., & Go, W. Y. (2017). Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(1), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.020>

Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, Kaplan RN, Patterson GH, Fry TJ, Orentas RJ, Mackall CL (2015) 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 21:581–590

Ma JS, Kim JY, Kazane SA, Choi SH, Yun HY, Kim MS, Rodgers DT, Pugh HM, Singer O, Sun SB, Fonslow BR, Kochenderfer JN, Wright TM, Schultz PG, Young TS, Kim CH, Cao Y (2016) Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E450–458

Ma Y, Conforti R, Aymeric L, Locher C, Kepp O, Kroemer G, Zitvogel L. How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Mar;30(1):71-82. doi: 10.1007/s10555-011-9283-2. PMID: 21298323.

Ma, F., Ho, J. Y., Du, H., Xuan, F., Wu, X., Wang, Q., Wang, L., Liu, Y., Ba, M., Wang, Y., Luo, J., & Li, J. (2019). Evidence of long-lasting anti-CD19 activity of engrafted CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells in a phase I study targeting pediatrics with acute lymphoblastic leukemia. *Hematological oncology*, 37(5), 601–608. <https://doi.org/10.1002/hon.2672>

Maude S, Barrett D. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *British Journal of Haematology.* 2015; 172(2): p. 11-22. 91. Gill S, June C. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev.* 2014; 263(1): p. 68-89. 92. Kalos M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells in CLL: the next chapter unfolds. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2016; 4(1).

Magalhaes, I., Kalland, I., Kochenderfer, J. N., Österborg, A., Uhlin, M., & Mattsson, J. (2018). CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells From Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Display an Elevated IFN- γ Production Profile. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 41(2), 73–83. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000193>

Moço, P. D., de Abreu Neto, M. S., Fantacini, D., & Picanço-Castro, V. (2020). Optimized Production of Lentiviral Vectors for CAR-T Cell. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2086, 69–76. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0146-4_5 Morgan M.A., Schambach A. Engineering CAR-T Cells for Improved Function Against Solid Tumors. *Front. Immunol.* 2018;9:2493. doi: 10.3389/fimmu.2018.02493.

Mollanoori, H., Shahraki, H., Rahmati, Y., & Teimourian, S. (2018). CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human immunology*, 79(12),876–882. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.09.007>

Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature reviews. Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>

Munshi, N. C., Anderson, L. D., Jr, Shah, N., Madduri, D., Berdeja, J., Lonial, S., Raje, N., Lin, Y., Siegel, D., Oriol, A., Moreau, P., Yakoub-Agha, I., Delforge, M., Cavo, M., Einsele, H., Goldschmidt, H., Weisel, K., Rambaldi, A., Reece, D., Petrocca, F., ... San-Miguel, J. (2021). Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine*, 384(8), 705–716. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024850>

Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L., Lekakis L.J., Miklos D.B., Jacobson C.A., Braunschweig I., Oluwole O.O., Siddiqi T., Lin Y., et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2017;377:2531–2544. doi: 10.1056/NEJMoa1707447.

Nobles CL, Sherrill-Mix S, Everett JK, Reddy S, Fraietta JA, Porter DL, Frey N, Gill SI, Grupp SA, Maude SL, Siegel DL, Levine BL, June CH, Lacey SF, Melenhorst JJ, Bushman FD. CD19-targeting CAR T cell immunotherapy outcomes correlate with genomic modification by vector integration. *J Clin Invest.* 2020 Feb 3;130(2):673-685. doi: 10.1172/JCI130144. PMID: 31845905; PMCID: PMC6994131.

Nobles, C. L., Sherrill-Mix, S., Everett, J. K., Reddy, S., Fraietta, J. A., Porter, D. L., Frey, N., Gill, S. I., Grupp, S. A., Maude, S. L., Siegel, D. L., Levine, B. L., June, C. H., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., & Bushman, F. D. (2020). CD19-targeting CAR T cell immunotherapy outcomes correlate with genomic modification by vector integration. *The Journal of clinical investigation*, 130(2), 673–685. <https://doi.org/10.1172/JCI130144>

Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L. y Fleury-Souverain, S. (2011). *Análisis de medicamentos contra el cáncer: una revisión. Talanta*, 85 (5), 2265–2289. doi: 10.1016 / j.talanta.2011.08.034

Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood*, 136(14),1632–1644.

<https://doi.org/10.1182/blood.2020005278> (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>

P. Serafini, I. Borrello, V. Bronte. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol*, 16 (2006), pp. 53-65.

Pan, J., Niu, Q., Deng, B., Liu, S., Wu, T., Gao, Z., Liu, Z., Zhang, Y., Qu, X., Zhang, Y., Liu, S., Ling, Z., Lin, Y., Zhao, Y., Song, Y., Tan, X., Zhang, Y., Li, Z., Yin, Z., Chen, B., ... Tong, C. (2019). CD22 CAR T-cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 33(12), 2854–2866. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0488-7>

Pan, J., Zuo, S., Deng, B., Xu, X., Li, C., Zheng, Q., Ling, Z., Song, W., Xu, J., Duan, J., Wang, Z., Yu, X., Chang, A. H., Feng, X., & Tong, C. (2020). Sequential CD19-22 CAR T therapy induces sustained remission in children with r/r B-ALL. *Blood*, 135(5),387–391. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003293>

Park, J. R., Digiusto, D. L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H. B., Bautista, C., Chang, W. C., Ostberg, J. R., & Jensen, M. C. (2007). Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(4), 825–833. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300104>

Patterson, A. D., Gonzalez, F. J., Perdew, G. H., & Peters, J. M. (2018). Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 165(2), 277–283. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy185>

Pegram, H. J., Park, J. H., & Brentjens, R. J. (2014). CD28z CARs and armored CARs. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 20(2), 127–133. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000034>

Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., & Schneck, J. (2015). Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides medical journal*, 6(1), e0004. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10179>

Pilleron S, Soto-Perez-de-Celis E, Vignat J, Ferlay J, Soerjomataram I, Bray F, Sarfati D. Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050. *Int J Cancer*. 2021 Feb 1;148(3):601-608. doi: 10.1002/ijc.33232. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32706917; PMCID: PMC7754149.

Plitas, G., & Rudensky, A. Y. (2016). Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer immunology research*, 4(9), 721–725. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0193>

Poorebrahim, M., Sadeghi, S., Fakhr, E., Abazari, M. F., Poortahmasebi, V., Kheirollahi, A., Askari, H., Rajabzadeh, A., Rastegarpanah, M., Linē, A., & Cid-Arregui, A. (2019). Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 56(6), 393–419. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1633512>

R. M., Neuberg, D. S., Soiffer, R., Dranoff, G., Ritz, J., ... Nikiforow, S. (2019). Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma. *Cancer immunology research*, 7(1), 100–112. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0307>

R. S., & Kipps, T. J. (2012). Gene immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia: a phase I study of intranodally injected adenovirus expressing a chimeric CD154 molecule. *Cancer research*, 72(12), 2937–2948. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3368>

Raje N., Berdeja J., Lin Y., Siegel D., Jagannath S., Madduri D., Liedtke M., Rosenblatt J., Maus M.V., Turka A., et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med*. 2019;380:1726–1737. doi: 10.1056/NEJMoa1817226.

Ramos, C. A., Grover, N. S., Beaven, A. W., Lulla, P. D., Wu, M. F., Ivanova, A., Wang, T., Shea, T. C., Rooney, C. M., Dittus, C., Park, S. I., Gee, A. P., Eldridge, P. W., McKay, K. L., Mehta, B., Cheng, C. J., Buchanan, F. B., Grilley,

Ramos, C. A., Savoldo, B., Torrano, V., Ballard, B., Zhang, H., Dakhova, O., Liu, E., Carrum, G., Kamble, R. T., Gee, A. P., Mei, Z., Wu, M. F., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Brenner, M. K., Heslop, H. E., & Dotti, G. (2016). Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated κ light chains. *The Journal of clinical investigation*, 126(7), 2588–2596. <https://doi.org/10.1172/JCI86000>

Rangel-Sosa, M. M., Aguilar-Córdova, E., & Rojas-Martínez, A. (2017). Immunotherapy and gene therapy as novel treatments for cancer. *Colombia medica (Cali, Colombia)*, 48(3), 138–<https://doi.org/10.25100/cm.v48i3.2997>

Raval, R. R., Sharabi, A. B., Walker, A. J., Drake, C. G., & Sharma, P. (2014). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2, 14. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-14>

Renrick, A. N., Dunbar, Z. T., & Shanker, A. (2019). Update on the current revolution in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 11(1), 15–20. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0135>

Rizvi, S., Shahzad, Y., Saleh, A. M., & Muhammad, N. (2020). Dose Issues in Cancer Chemotherapy. *Oncology*, 98(8), 520–527. <https://doi.org/10.1159/000506705>

Rossi, J., Paczkowski, P., Shen, Y. W., Morse, K., Flynn, B., Kaiser, A., Ng, C., Gallatin, K., Cain, T., Fan, R., Mackay, S., Heath, J. R., Rosenberg, S. A., Kochenderfer, J. N., Zhou, J., & Bot, A. (2018). Preinfusion polyfunctional anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with clinical outcomes in NHL. *Blood*, 132(8), 804–814. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-828343>

Ruark, J., Mullane, E., Cleary, N., Cordeiro, A., Bezerra, E. D., Wu, V., Voutsinas, J., Shaw, B. E., Flynn, K. E., Lee, S. J., Turtle, C. J., Maloney, D. G., Fann, J. R., & Bar, M. (2020). Patient-Reported Neuropsychiatric Outcomes of Long-Term Survivors after Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 26(1), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.09.037>

Samur, M.K., Fulciniti, M., Aktas Samur, A. *et al.* Biallelic loss of BCMA as a resistance mechanism to CAR T cell therapy in a patient with multiple myeloma. *Nat Commun* **12**, 868 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21177-5>

Sauter, C. S., Senechal, B., Rivière, I., Ni, A., Bernal, Y., Wang, X., Purdon, T., Hall, M., Singh, A. N., Szenes, V. Z., Yoo, S., Dogan, A., Wang, Y., Moskowitz, Schietinger A., Philip M., Krisnawan V.E., Chiu E.Y., Delrow J.J., Basom R.S., Lauer P., Brockstedt D.G., Knoblaugh S.E., Hammerling G.J., *et al.* Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity*. 2016;45:389–401. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.011.

Scholler, J., Brady, T. L., Binder-Scholl, G., Hwang, W. T., Plesa, G., Hege, K. M., Vogel, A. N., Kalos, M., Riley, J. L., Deeks, S. G., Mitsuyasu, R. T., Bernstein, W. B., Aronson, N. E., Levine, B. L., Bushman, F. D., & June, C.

Schubert, M. L., Schmitt, A., Sellner, L., Neuber, B., Kunz, J., Wuchter, P., Kunz, A., Gern, U., Michels, B., Hofmann, S., Hückelhoven-Krauss, A., Kulozik, A., Ho, A. D., Müller-Tidow, C., Dreger, P., & Schmitt, M. (2019). Treatment of patients with relapsed or refractory CD19+ lymphoid disease with T lymphocytes transduced by RV-SFG.CD19.CD28.4-1BBzeta retroviral vector: a unicentre phase I/II clinical trial protocol. *BMJ open*, *9*(5), e026644. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026644>

Schuster S.J., Svoboda J., Chong E.A., Nasta S.D., Mato A.R., Anak O., Brogdon J.L., Pruteanu-Malinici I., Bhoj V., Landsburg D., *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2017;377:2545–2554. doi: 10.1056/NEJMoa1708566.

Schuster, S. J., Bishop, M. R., Tam, C. S., Waller, E. K., Borchmann, P., McGuirk, J. P., Jäger, U., Jaglowski, S., Andreadis, C., Westin, J. R., Fleury, I., Bachanova, V., Foley, S. R., Ho, P. J., Mielke, S., Magenau, J. M., Holte, H., Pantano, S., Pacaud, L. B., Awasthi, R., ... JULIET Investigators (2019). Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine*, *380*(1), 45–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804980>

Sermer, D., & Brentjens, R. (2019). CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematological oncology*, 37 Suppl 1, 95–100. <https://doi.org/10.1002/hon.2591> Sending CAR T Cells After Multiple Myeloma. (2017). *Cancer discovery*, 7(8), OF9. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-088>

Shah, N. N., Johnson, B. D., Schneider, D., Zhu, F., Szabo, A., Keever-Taylor, C. A., Krueger, W., Worden, A. A., Kadan, M. J., Yim, S., Cunningham, A., Hamadani, M., Fenske, T. S., Dropulić, B., Orentas, R., & Hari, P. (2020). Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. *Nature medicine*, 26(10), 1569–1575. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1081-3>

Sterner, R. M., Cox, M. J., Sakemura, R., & Kenderian, S. S. (2019). Using CRISPR/Cas9 to Knock Out GM-CSF in CAR-T Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (149), 10.3791/59629. <https://doi.org/10.3791/59629>

Stroncek, D. F., Lee, D. W., Ren, J., Sabatino, M., Highfill, S., Khuu, H., Shah, N. N., Kaplan, R. N., Fry, T. J., & Mackall, C. L. (2017). Elutriated lymphocytes for manufacturing chimeric antigen receptor T cells. *Journal of translational medicine*, 15(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1160-5>

Sun, L., Lutz, B. M., & Tao, Y. X. (2016). The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. *Translational perioperative and pain medicine*, 1(3), 22–33.

Svoboda, J., Rheingold, S. R., Gill, S. I., Grupp, S. A., Lacey, S. F., Kulikovskaya, I., Suhoski, M. M., Melenhorst, J. J., Loudon, B., Mato, A. R., Nasta, S. D., Landsburg, D. J., Youngman, M. R., Levine, B. L., Porter, D. L., June, C. H., & Schuster, S. J. (2018). Nonviral RNA chimeric antigen receptor- modified T cells in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood*, 132(10), 1022– 1026. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-837609>

Taghiloo S., Allahmoradi E., Tehrani M., Hossein-Nataj H., Shekarriz R., Janbabaei G., Abediankenari S., Asgarian-Omran H. Frequency and functional

characterization of exhausted CD8+ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur. J. Haematol.* 2017;98:622–631. doi: 10.1111/ejh.12880.

Tang, X. Y., Sun, Y., Zhang, A., Hu, G. L., Cao, W., Wang, D. H., Zhang, B., & Chen, H. (2016). Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ open*, 6(12), e013904. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-013904>

Tian T, Olson S, Whitacre JM, Harding A. The origins of cancer robustness and evolvability. *Integr Biol (Camb)*. 2011 Jan;3(1):17-30. doi: 10.1039/c0ib00046a. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20944865, OMS 2021.

Titov, A., Petukhov, A., Staliarova, A., Motorin, D., Bulatov, E., Shuvalov, O., Soond, S. M., Piacentini, M., Melino, G., Zaritskey, A., & Barlev, N. A. (2018). The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy- associated toxicities. *Cell death & disease*, 9(9), 897. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0918-x>

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A., Hanafi, L. A., Berger, C., Gooley, T. A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T. M., Robinson, E., Steevens, N. N., Chaney, C., Soma, L., Chen, X., Yeung, C., Wood, B., Li, D., Cao, J., Heimfeld, S., ... Maloney, D. G. (2016). CD19 CAR- T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *The Journal of clinical investigation*, 126(6), 2123–2138. <https://doi.org/10.1172/JCI85309>

Van der Loo, J. C., & Wright, J. F. (2016). Progress and challenges in viral vector manufacturing. *Human molecular genetics*, 25(R1), R42–R52. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv451>

Verghese, S. C., Goloviznina, N. A., Skinner, A. M., Lipps, H. J., & Kurre, P. (2014). S/MAR sequence confers long-term mitotic stability on non-integrating lentiviral vector episomes without selection. *Nucleic acids research*, 42(7), e53-e53.

Vucinic, V., Quaiser, A., Lückemeier, P., Fricke, S., Platzbecker, U., & Koehl, U. (2021). Production and Application of CAR T Cells: Current and Future Role of

Europe. *Frontiers in medicine*, 8, 713401.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.713401>

Wang X, Chang W, Wong C, Colcher D, Sherman M, Ostberg J. transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 2011; 118(5): p. 1255-1263. 89.

Wang, C. M., Wu, Z. Q., Wang, Y., Guo, Y. L., Dai, H. R., Wang, X. H., Li, X., Zhang, Y. J., Zhang, W. Y., Chen, M. X., Zhang, Y., Feng, K. C., Liu, Y., Li, S. X., Yang, Q. M., & Han, W. D. (2017). Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(5), 1156–1166.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1365>

Wang, N., Hu, X., Cao, W., Li, C., Xiao, Y., Cao, Y., Gu, C., Zhang, S., Chen, L., Cheng, J., Wang, G., Zhou, X., Zheng, M., Mao, X., Jiang, L., Wang, D., Wang, Q., Lou, Y., Cai, H., Yan, D., ... Huang, L. (2020). Efficacy and safety of CAR19/22 T-cell cocktail therapy in patients with refractory/relapsed B-cell malignancies. *Blood*, 135(1), 17–27. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000017>

Wang, Q. S., Wang, Y., Lv, H. Y., Han, Q. W., Fan, H., Guo, B., Wang, L. L., & Han, W. D. (2015). Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(1), 184–191. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.164>

Wylie, B., Macri, C., Mintern, J. D., & Waithman, J. (2019). Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers*, 11(4), 521. <https://doi.org/10.3390/cancers11040521>

Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C. A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C. J., Gee, A. P., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Savoldo, B., & Dotti, G. (2014). Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*, 123(24), 3750–3759. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-552174>

Yan, Z. X., Li, L., Wang, W., OuYang, B. S., Cheng, S., Wang, L., Wu, W., Xu, P. P., Muftuoglu, M., Hao, M., Yang, S., Zhang, M. C., Zheng, Z., Li, J., & Zhao, W. L. (2019). Clinical Efficacy and Tumor Microenvironment Influence in a Dose-Escalation Study of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(23), 6995–7003. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0101>

Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3335-7. doi: 10.1172/JCI83871. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26325031; PMCID: PMC4588312.

Yeku, O. O., & Brentjens, R. J. (2016). Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochemical Society transactions*, 44(2), 412–418. <https://doi.org/10.1042/BST20150291>

Ying, Z., Huang, X. F., Xiang, X., Liu, Y., Kang, X., Song, Y., Guo, X., Liu, H., Ding, N., Zhang, T., Duan, P., Lin, Y., Zheng, W., Wang, X., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Zhang, C., Liu, W., Deng, L., ... Chen, S. Y. (2019). A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nature medicine*, 25(6), 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0421-7>

Zhang, E., & Xu, H. (2017). A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0379-6>

Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):59-73. doi: 10.1038/nri2216. PMID: 18097448

TERAPIA CAR-T

RECEPTOR QUIMÉRICO DE ANTIGENO DE LINFOCITOS T

