



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE Biotecnología – Biología Vegetal

***Terapias celulares basadas en Linfocitos CAR-T:
Nuevas oportunidades en el tratamiento frente al
cáncer***

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora: Paula Ercilla Rodríguez

**Tutora: Carmen Ramírez Castillejo
Co-Tutora: Raquel González Martos**

Junio de 2023



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior De
Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**TERAPIAS CELULARES BASADAS EN LINFOCITOS CAR-T: NUEVAS
OPORTUNIDADES EN EL TRATAMIENTO FRENTE AL CÁNCER**

TRABAJO FIN DE GRADO

Paula Ercilla Rodríguez

MADRID, 2023

Tutor (o cotutores): Nombre Apellidos

Carmen Ramírez Castillejo

Raquel González Martos

Dpto de Biotecnología-Biología Celular. ETSIAAB. UPM



**TERAPIAS CELULARES BASADAS EN LINFOCITOS CAR-T: NUEVAS
OPORTUNIDADES EN EL TRATAMIENTO FRENTE AL CÁNCER**

**Memoria presentada por Paula Ercilla Rodríguez para la obtención
del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad
Politécnica de Madrid**

Fdo: Paula Ercilla Rodríguez

VºBº Tutora y directora del TFG

Dra. Carmen Ramírez Castillejo

Profesor Titular

Dpto de Biotecnología-Biología Vegetal ETSIAAB. UPM

VºBº Cotutora

Doña Raquel González Martos

Investigadora

Centro de Tecnología Biomédica-Universidad Politécnica de Madrid

Madrid junio 2023

DEDICATORIA:

A la gente que ya no está, por hacerse sentir incluso sin estarlo, los que no tuvieron oportunidad de curarse, su lucha no fue en vano, pues su valentía y coraje continúan.

Por ti yaya, la persona que más me ha ayudado en esta vida por muy complicado, desde el día que fui consciente de porque te fuiste, prometí al cielo que encontraría respuestas, soluciones y esperanza para aquellos que se enfrentan a esta dura travesía. Se que este trabajo solo es un pequeño comienzo de un largo camino, lleno de desafíos, pero no pararé hasta ver un mundo donde el cáncer no se lleve a las personas que queremos.

Esta es mi promesa a ti, yaya, abuela, y a todos los que luchan y lucharon contra el cáncer. Por ti, por ellos, esto es solo el comienzo de una lucha que no parará hasta que la victoria sea nuestra.

A ti primo, que sé que vas a estar ahí como me prometiste y nunca me vas a dejar sola, te quiero wasabi.

AGRADECIMIENTOS:

A mamá, por aguantar mis cambios de humor durante tantos años, mis agobios de última hora y mi mala organización. Por enseñarme a tirar siempre hacia delante sin mirar atrás, por apoyarme en las ideas más estúpidas que he tenido y sobre todo en ayudarme a perseguir mis sueños. Por ser tan pesada con los estudios, pero he decir una cosa, no hay mayor placer en el mundo que poder disfrutar de ella todos los días.

A papá, por ser mi oyente, aunque no se entere de nada de lo que le cuento, aunque hace el amago de debatir y cuestionarme las cosas y aunque le tenga que explicar 500 veces más lo que es la biotecnología, seguiremos sin avanzar. Gracias por enseñarme todo lo que se, ya que, aunque sé que te parezca poco, sin que me explicaras mil veces la lección de historia no habría podido llegar hasta aquí.

A mi hermana, que, aunque no lo crea es una de las personas más importante de mi vida, sé que por mucho que me chinches, te voy a tener para toda la vida y tú a mí, aunque me ponga pesada muchas veces con los estudios.

A mi familia, por entenderme cuando no podía ir a los eventos familiares por tener que estudiar y lo mucho que me arrepiento de ello. Gracias por estar ahí apoyándome en todo momento. Por apoyarme y escucharme siempre, por facilitarme la vida y por estar siempre ahí.

A ti Adam, por estar a mi lado, aguantarme y llevarte la peor parte, por no dejarme sola y entenderme y siempre tranquilizándome en los momentos difíciles. Espero que terminando esta etapa podamos seguir recopilando muchos más momentos juntos, te quiero no lo dudes.

A ti John, por volver a aparecer en mi vida y volverla patas arriba y por ir de fiesta en fiesta. Gracias por haberme dado tu apoyo siempre que lo he necesitado, quien diría cuando nos conocimos por primera vez que serías mi mejor amigo. Espero que no te vayas nunca que me quedo sin mi coche.

A ti Coral, por ayudarme en momentos difíciles (y con la estadística de la carrera la cual todavía no entiendo), gracias por estar ahí en los momentos difíciles. Me alegro de haber elegido bien el instituto que me ha brindado una amiga como tú que sé que va a ser para toda la vida.

A Sofía, Alex y Sergio por compartir estos 4 años juntos y llevarme lo mejorcito de la clase para toda la vida, por compartir aventuras, desafíos, trabajos de última hora y llantos y estudios hasta la madrugada, pero también momentos felices que son los que seguramente nos quedaremos para siempre

A Carmen y Raquel, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por brindarme esta oportunidad única de clarificar mis deseos y metas para el futuro.

ÍNDICE:

DEDICATORIA:	iv
AGRADECIMIENTOS:	v
Índice de tablas.....	vii
Índice de figuras:.....	viii
Lista de abreviaturas	ix
RESUMEN	xi
CAPÍTULO I: Introducción y objetivos	1
CAPÍTULO II: Material y métodos	3
CAPÍTULO III: Resultados y discusión	5
1. La inmunidad antitumoral	5
1.1. Inmunidad antitumoral y muerte Inmunogénica	5
1.2. Ciclo de Inmunidad antitumoral.....	7
1.3. Evasión de la respuesta inmune por parte de los tumores	8
2. La inmunoterapia oncológica	10
2.1. Anticuerpos monoclonales moduladores.....	11
2.2. Transferencia adoptiva de Células T (ACT)	11
3. ¿Qué es un linfocito T transducido con receptor de antígeno quimérico (CAR-T)?.....	12
3.1. Estructura de los receptores de antígenos quiméricos	13
3.1.1. Ectodominio	13
3.1.2. Bisagras y dominio transmembrana	14
3.1.3. Dominio intracelular o endodominio	15
3.2. Generación y manufactura de linfocitos CAR-T a gran escala de grado clínico	17
3.2.1. Determinación y selección del antígeno diana	18
3.2.2. Elección del vector	19
4. Aplicaciones clínicas.....	21
4.1. Compuestos o terapias aprobadas.....	21
4.2. Ensayos clínicos	22
4.2. Aplicaciones en neoplasias hematológicas.....	23
4.3. CARs en el tratamiento de tumores sólidos	25
5. Limitaciones generales o efectos secundarios.....	26
5.1. Síndrome de liberación de citoquinas (CRS)	26
5.2. Neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunitarias (ICANS)	26
5.3 Estrategias de seguridad para eliminar las toxicidades generadas por los CAR-T ...	27
CAPÍTULO IV: Conclusiones y perspectivas de futuro	28
CAPÍTULO V: Bibliografía	30
Anexos.....	1

Índice de tablas

Tabla 1: Efecto generado en función de los factores que establecen la muerte celular inmunogénica.....	7
Tabla 2: Terapias CAR-T aprobadas por la FDA hasta 2023.....	21
Tabla 3: Antígenos diana de CAR-T para el tratamiento de LLA-B junto a la estructura CAR...23	
Tabla 4: Antígenos asociados de tumor investigados activamente en ensayos clínicos.....	34

Índice de figuras:

Figura 1: Número estimado de incidencia (A) y de defunciones (B) de ambos sexos y edades en el mundo clasificados por tipo de cáncer.....	1
Figura 2: Gráfico representativo de los artículos disponibles en la base de datos Pubmed en los últimos 10 años.....	3
Figura 3: Diagrama de flujo del proceso de búsqueda y selección de ensayos clínicos utilizando la herramienta PRISMA.....	4
Figura 4: Etapas de la inmunoedición del cancer.....	5
Figura 5. Ciclo de la respuesta inmune antitumoral.....	8
Figura 6: Moléculas y subgrupos celulares implicados en la inducción de un ambiente inmunosupresor o respuesta inmune activa.....	9
Figura 7: Enfoques actuales en el campo de la inmunoterapia frente al cáncer.....	10
Figura 8: Diferentes estrategias de Transferencia adoptiva de células T (ACT) para el tratamiento frente al cáncer.....	12
Figura 9: Representación de la estructura de las distintas generaciones de CAR.....	15
Figura 10: Plano de diseño de los diferentes CAR.....	17
Figura 11: Generación de CAR-T de grado GMP.....	18
Figura 12: Distribución y número de los ensayos clínicos registrados en el mundo por país.....	22
Figura 13: Estado general de los ensayos clínicos con CAR-T para el tratamiento del cáncer....	22
Figura 14: Número de ensayos registrados para el tratamiento de cáncer con CAR-T.....	23
Figura 15: Desafíos principales para lograr el éxito en la terapia CAR-T para tumores sólidos...	25
Figura 16: Sistemas de seguridad basados en genes suicidas.....	27

Lista de abreviaturas

- OMS: organización mundial de la salud
- GLOBOCAN: Global Cancer Observatory
- VPH: virus del papiloma humano
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- TLP: tiempo libre de progresión
- OS: respuesta objetiva
- CAR-T: linfocitos T transducidos con receptores de antígenos quiméricos
- ASCO: American Society of Clinical Oncology,
- EMA: European Medicines Agency
- FDA: Food and Drug Administration
- NCI: National Cancer Institute)
- ACS: American Cancer Society
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
- NCBI: National Center of Biotechnology Information
- NK: natural killer
- SI: sistema inmune
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
- TCR: receptor de linfocitos T
- TME: ambiente tumoral supresor
- MCI: muerte celular inmunogénica
- DAMPs: patrones moleculares asociados a daños celulares
- PRR: recetores de reconocimiento de patrones
- MEC: matriz extracelular
- APC: células presentadoras de antígenos
- DC: células dendríticas
- IL: Interleucina
- IFN- α : Interferón *Alpha*
- CD8: Linfocitos T efectores
- CD4: linfocitos T cooperadores
- Treg: Linfocitos T reguladores
- Tc1: linfocitos T CD8 citotoxicos
- TNF: factor de necrosis tumoral
- IFN- γ : interferón *gamma*
- CTLA-4: proteína asociada a linfocitos T citotóxicos
- PD-1: proteína de muerte celular programada 1
- TILs: linfocitos T infiltrantes de tumor
- TGF-B: factor de crecimiento transformador beta
- MDSC: células supresoras derivadas de la línea mieloide
- mAbs: anticuerpos monoclonales
- ACT: transferencia adoptiva de células T
- Ig: inmunoglobulina
- ICIs: inhibidores de punto de control inmunitario
- CDC: citotoxicidad mediada por complemento
- ADCC: citotoxicidad dependiente de anticuerpos
- CD $\cdot\cdot$: clúster de diferenciación
- GVHD: enfermedad de injerto contra huésped
- PMBC: células mononucleares de sangre periférica
- PBL: linfocitos de sangre periférica
- LAKs: células asesinas activadas por linfoquina

- AATs: antígenos asociados a tumores
- CAR: receptor de antígenos quiméricos
- IECS: células citotóxicas del sistema inmunológico
- ECD: dominio extracelular o ectodominio
- scFv: fragmento variable monocatenario de inmunoglobulina
- pMHC: péptido MHC
- Fc: fracción constante
- FcγR: receptor de fracción constante
- AICD: muerte celular inducida por activación
- ITAM: motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora
- NK-KB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
- TRUCK: linfocitos T redirigidos por CAR para la destrucción universal por citoquinas
- NFAT: factor nuclear de activación de linfocitos T
- GMP: buenas prácticas de fabricación
- TSA: antígenos específicos de tumor
- SNP: mutaciones de un solo nucleótido
- LTR: repeticiones terminales largas
- VLS: vectores lentivirales
- GOI: gen de interés
- SB: Vector sleeping beauty
- PB: vector piggyBac
- ITRs: secuencias repetitivas invertidas
- PBasa: transposasa del vector PB
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- LLA: leucemia linfoblástica aguda
- LDCBG: linfoma difuso de células B grandes
- BMCA: antígeno de maduración de linfocitos B
- LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda de células B
- MM: mieloma múltiple
- LF: linfoma folicular
- LCM: Linfoma de células del manto
- CR: respuesta completa
- ORR; ratio de respuesta objetiva
- TR: tasa de respuesta
- LNH: Linfoma No-Hodgkin
- LMA: leucemia mieloide aguda
- LLC: leucemia linfoide crónica
- LH: linfoma hodgkin
- LLC-B: Leucemia linfocítica aguda de células B
- RC: remisión completa
- MRD: mínima enfermedad residual
- ICANS: neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunitarias
- CRS: síndrome de liberación de citoquinas
- SNC: sistema nervioso central
- BHE: barrera hematoencefálica
- HSV-tk: timidina quinasa del virus herpes simple
- CID: fármaco inductor de dimerización
- iCasp9: gen de interruptor de seguridad inducible caspasa 9

RESUMEN

In the last decades, immunotherapy has witnessed remarkable advancements due to the development of fascinating strategies for cancer treatment, such as checkpoint blockade antibodies and adoptive T cell transfer. In this context, chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) emerged as an effort to combine these novel strategies and minimize their individual limitations. Therefore, this present undergraduate thesis examines the role of CAR-T cells as a living drug for cancer treatment. These genetically engineered immune cells are designed to selectively eliminate tumor cells by recognizing a specific antigen on the tumor surface. Throughout this literature review, the latest advancements in CAR-T cell technology are examined, including structure optimization and generations, as well as the manufacturing process for their subsequent clinical application. Gene therapy strategies for introducing the desired CAR gene are also addressed. Additionally, a comprehensive overview of the current state of therapy in clinical applications, both in hematologic cancers and solid tumors, is provided, highlighting the limitations and challenges that need to be addressed to achieve success in each of these contexts. Later, associated side effects are discussed, and a potential suicide gene-based mechanism is proposed to mitigate these toxicities and enhance therapy safety. Finally, various future perspectives are presented that could contribute to improving the identified limitations during the review. In conclusion, this study provides a comprehensive insight into the use of CAR-T cells in cancer, emphasizing their potential and the need for ongoing research to enhance their efficacy and safety for the benefit of oncology patients.

CAPÍTULO I: Introducción y objetivos

Cáncer es un término genérico que engloba una amplia gama de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales en cualquier parte del organismo. Estas poblaciones de células poseen características distintivas: presentan una proliferación descontrolada, escasa diferenciación, y algunas de estas células tienen la capacidad de propagarse a tejidos u órganos adyacentes, así como lejanos, en un proceso denominado metástasis (1). Esta transformación es el resultado de la acumulación de mutaciones en el tiempo puesto que el genoma de estas células anormales adquiere alelos mutados de oncogenes, genes supresores de tumores y otros que controlan de manera directa o indirectamente la proliferación celular (2) afectando a diversas funciones a nivel molecular, celular, tisular y sistémico (3).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, ya sea en adultos o en niños, quedando solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares (4). En 2020 el número estimado de nuevos casos fue 19,3 millones y se registraron 9,96 millones de fallecimientos (5). Según la base de datos Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) se espera que la incidencia alcance 28,4 millones de casos en 2040, lo que supone un incremento de casi el 50% respecto a estos últimos años, debido al aumento de la esperanza de vida y de la población, además de la exposición masiva a los distintos factores de riesgo.

A nivel mundial las tasas de incidencia más alta se corresponden a: cáncer de mama (11,7%), de pulmón (11,4%), colorrectal (10%), de próstata (7,3%) y de estómago (5,6%); siendo los de mayor mortalidad el cáncer de pulmón (18%), colorrectal (9,4%), de hígado (8,3%), estómago (7,7%) y de mama (6,9%), como se puede ver en la figura 1:

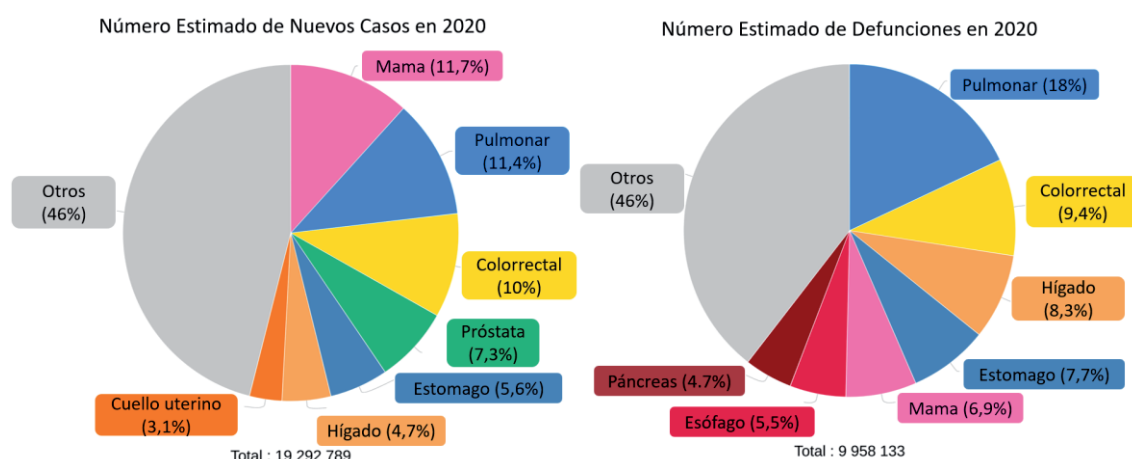


Figura 1: Número estimado de incidencia (A) y de defunciones (B) de ambos sexos y edades en el mundo clasificados por tipo de cáncer. Adaptada de: (6)

El cáncer no está causado por un único factor, sino que es el resultado de la interacción de distintos factores de riesgo, siendo así que entre el 90-95% está causado por factores ambientales mientras que el 5-10% restante tiene componente genético (7). El tabaquismo es el principal factor de riesgo y el mayor responsable del cáncer de pulmón, aumentando también el riesgo de sufrir otros tipos de cánceres como de boca, laringe, faringe, etc. Otros factores de riesgo son el alcohol, obesidad, la radiación ultravioleta e incluso diferentes agentes infecciosos como el Virus del Papiloma Humano (VPH) o el Virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH), entre otros (8)). También habría que mencionar otros factores de riesgo como el envejecimiento, la herencia genética y la acumulación de daños en el DNA (9).

Actualmente la investigación se centra en la búsqueda de tratamientos efectivos que presenten una disminución de las defunciones, un aumento del porcentaje de supervivencia y del tiempo libre de progresión (TLP), así como la respuesta objetiva (OS) en comparación con los tratamientos ‘convencionales’ como la quimioterapia o radioterapia. Por ello, la inmunoterapia es uno de los tratamientos en auge en investigación que consiste en mejorar la capacidad del sistema inmunitario para combatir enfermedades. En ella se incluyen los Linfocitos T transducidos con receptor de antígenos quiméricos (CAR-T).

El **objetivo principal** de esta revisión bibliográfica es describir la terapia basada en Linfocitos CAR-T. Para ello, abordaremos los siguientes objetivos secundarios:

Los **objetivos secundarios** son:

- Describir las principales bases moleculares y mecanismos de la respuesta inmune frente a tumores
- Describir las distintas inmunoterapias que llevaron al desarrollo de los CAR-T
- Hacer un análisis del estado clínico en el que se encuentran, detallando su papel en el tratamiento frente al cáncer.
- Valorar los obstáculos y las perspectivas de futuro de la terapia descrita.

CAPÍTULO II: Material y métodos

Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica de literatura científica en relación con el tema elegido entre Enero y Mayo de 2023, en libros, diferentes bases de datos y algunas páginas web oficiales tales como la ASCO (American Society of Clinical Oncology), EMA (European Medicines Agency), FDA (Food and Drug Administration), NCI (National Cancer Institute), ACS (American Cancer Society) y SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) entre otras.

Para la búsqueda de artículos se utilizó la base de datos PubMed desarrollado por el ‘National Center of Biotechnology Information’ (NCBI), con el objetivo de identificar todas las publicaciones que describan la estructura, función, síntesis y aplicaciones de los CAR-T. Los términos de búsqueda que mayoritariamente fueron utilizados son ‘T-CAR cells’, ‘Chimeric antigen receptor’, ‘adoptive cell therapy’, ‘immunotherapy’ y ‘cancer’. Se presentan dos gráficos que muestran el recuento de artículos disponibles en la base de datos Pubmed, específicamente enfocados en Inmunoterapias (Figura X.1), así como la Terapia CAR-T (Figura X.2). Estas representaciones graficas ofrecen una visión cuantitativa del volumen de investigación existente en relación con estas áreas temáticas específicas.

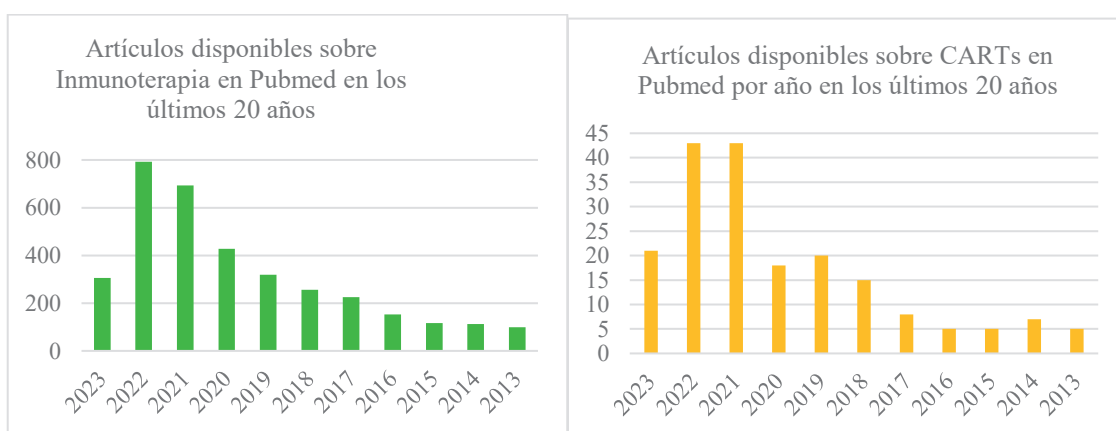


Figura 2: Gráfico representativo de los artículos disponibles en la base de datos Pubmed en los últimos 10 años. Figura 2.1: muestra el número de artículos de inmunoterapia. Figura 2.2: muestra los artículos disponibles solamente de la terapia CAR-T.

Las búsquedas anteriores se modificaron mediante operadores booleanos para evitar la inclusión de artículos centrados en otras terapias adoptivas de células como los NK-CAR, CAR-macrofago o los trasplantes de células madres hematopoyticas, por tanto la combinación de términos utilizada finalmente fue la siguiente “(chimeric antigen receptor[Title/Abstract] OR car[Title/Abstract]) AND (t cell[Title/Abstract]) NOT (cell, nk[MeSH Terms]) NOT (hematopoietic stem cell transplantation[MeSH Terms]) NOT (stem cell transplant[Title/Abstract]) NOT (stem cell transplantation[Title/Abstract]) NOT (car nk[Title/Abstract]) NOT (chimeric antigen receptor nk[Title/Abstract]) NOT (CAR-macrophage cells[Title/Abstract]) AND (cancer)”

Los artículos obtenidos a partir de la búsqueda bibliográfica se seleccionaron siguiendo los criterios de exclusión e inclusión previamente establecidos, incluyendo exclusivamente artículos basados en los linfocitos CAR-T en relación con la inmunoterapia como tratamiento frente al cáncer. Se excluyeron artículos que no estaban disponibles en texto completo y artículos en idioma diferente a español e inglés, además de los que no aportaban información clara y suficiente sobre los resultados obtenidos o datos contradictorios con otros estudios llegando a utilizar 96 de esos artículos

En este trabajo también se consultaron libros de oncología, inmunología, patología y biología celular para la elaboración de diversos apartados tales como la introducción y el primer apartado del capítulo tercero (La inmunidad antitumoral).

Por otro lado, para profundizar en ciertos temas de dicha revisión se utilizaron otras palabras clave distintas a las mencionadas como “generation” o “structure” para estudiar las diferentes estructuras y generaciones del receptor o “solid tumor” o “hematologic neoplasms” para conocer los avances en estos campos.

Por último, se realizó un análisis de los ensayos clínicos actuales de los T-CAR mediante la página web clinicaltrials.gov siguiendo el diagrama de flujo de la herramienta PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)(10). El proceso de búsqueda involucró un cribado exhaustivo y criterios de selección para identificar estudios relevantes, eliminando los ensayos clínicos dirigidos a otras enfermedades como enfermedades autoinmunes, ensayos en los que se utilizan otro tipo de célula como los natural killer, ensayos donde no se mide la eficacia y seguridad de los CAR-T como objetivo principal además de los ensayos clínicos de terapias combinatorias, entre otros criterios de exclusión obteniendo el siguiente resultado (figura 3)

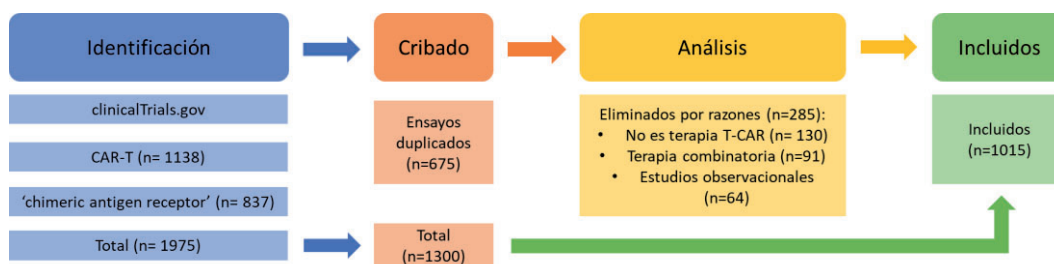


Figura 3: Diagrama de flujo del proceso de búsqueda y selección de ensayos clínicos utilizando la herramienta PRISMA. El diagrama de flujo ilustra el proceso sistemático y transparente seguido para identificar y seleccionar los ensayos clínicos relevantes que se incluyen en el análisis. Siguiendo las directrices de la herramienta PRISMA se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos de Clinicaltrials.gov (11) utilizando términos de búsqueda pertinentes, cribado y análisis.

Las fuentes consultadas en la realización de esta revisión bibliográfica se citan en el capítulo V.

CAPÍTULO III: Resultados y discusión

1. La inmunidad antitumoral

El sistema inmunológico, también conocido como sistema inmune (SI), es un conjunto de células, tejidos y órganos que colaboran en conjunto para la activación de una respuesta inmune. Esta respuesta inmunológica engloba los mecanismos y procesos para reconocer y defenderse contra agentes invasores como patógenos (virus, bacterias, parásitos...) y células tumorales. Se caracteriza por ser una respuesta altamente coordinada y compleja que involucra diferentes componentes del sistema inmunológico incluyendo células especializadas (como Linfocitos, macrófagos, NK y dendríticas), moléculas (como anticuerpos y citoquinas) y órganos linfoides (como el bazo y ganglios linfáticos), mediante el reconocimiento de antígenos extraños.

Para que las células tumorales puedan ser eliminadas por el SI, los antígenos tumorales deben ser presentados a través del complejo principal de histocompatibilidad de clase I o de clase II (MHC I o II) y que la unión antígeno-MHC sea reconocido por un receptor de LT (TCR)

1.1. Inmunidad antitumoral y muerte Immunogénica

El sistema inmune posee un papel central en la eliminación de las células tumorales. Este papel fue propuesto por Paul Ehrlich y posteriormente estudiado en profundidad por Thomas y Burnet, quienes propusieron el término “inmunovigilancia” el cual hace referencia a la capacidad del sistema inmune para detectar y eliminar las células tumorales, evitando el desarrollo de la enfermedad (12). En la actualidad, este concepto ha sido ampliado hacia la immunoedición la cual consta de tres etapas: eliminación, equilibrio y escape, las cuales se pueden ver en la figura 4.

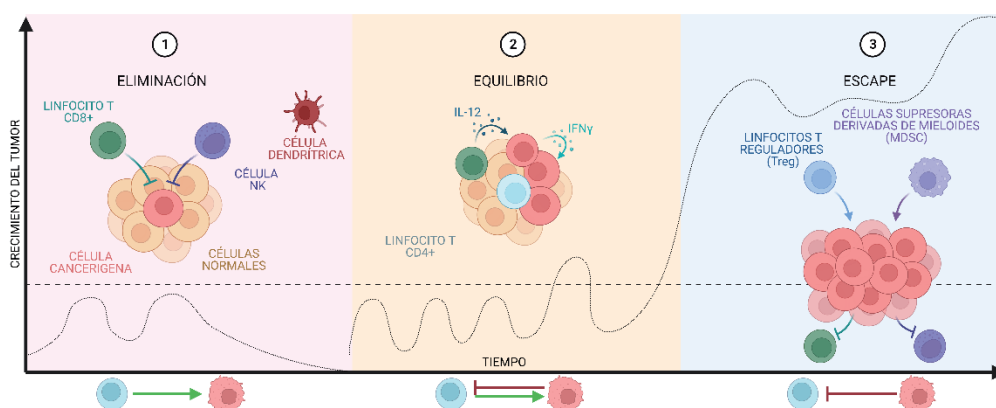


Figura 4: Etapas de la immunoedición del cáncer. En la gráfica se ve el crecimiento del tumor en las diferentes etapas de la inmunovigilancia desarrollada por Thomas y Burnet

La fase de eliminación representa la idea clásica de la inmunovigilancia propuesta por Burnet. Después de que se haya producido la transformación y hayan fallado los mecanismos supresores de tumor intrínsecos no inmunológicos, se activa conjuntamente el sistema inmune innato y adaptativo para destruir el tumor, (13) ya que es capaz de reconocer antígenos tumorales

específicos y desarrollar una respuesta efectora adecuada sobre las células transformadas que los expresan.

Sin embargo, si no se logra erradicar el tumor, se entra en la fase de equilibrio, en la cual el crecimiento se restringe inmunológicamente, pero no se elimina por completo. La duración de esta fase varía en cada paciente ya que está influida por la estructura y el ambiente tumoral supresor (TME) establecido. Este estado de equilibrio puede llevar al escape tumoral, donde las células tumorales reclutan células del SI para crear un TME inmunosupresor y estas células a su vez inducen a las células tumorales a expresar moléculas de control inmunitario (13).

Por otro lado, la muerte celular inmunogénica (MCI) es una forma de muerte celular regulada que activa la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T citotóxicos formando memoria inmunológica a largo plazo (14). Está asociada con la liberación de patrones moleculares relacionados con daños celulares (DAMPs). Para que la MCI establezca una respuesta inmune adaptativa, es importante contar con factores (tabla 1) como: la antigenicidad (capacidad de una molécula o antígeno para ser reconocido por los anticuerpos que constituyen una respuesta inmunitaria y viene dada por la expresión y presentación de antígenos que no inducen la eliminación clonal del huésped), la adyuvancia (liberación de DAMPs debido al estrés o daño celular) (15) y un microambiente permisivo (14).

Con respecto a la antigenicidad, en ausencia de antígenos no sujetos a la tolerancia central o periférica, la MCI solo puede desencadenar respuestas inflamatorias sin activar la inmunidad adaptativa. Sin embargo, cuando hay antigenicidad presente y suficiente adyuvancia la MCI puede activar la respuesta adaptativa. En caso contrario se induciría un estado de tolerancia. En el caso de los tumores, la alta tasa de mutaciones en las regiones codificantes del genoma (mutaciones puntuales de cambio de marco de lectura y no sinónimas) puede dar lugar a la exposición de neoantígenos tumorales, incrementando la antigenicidad. Además, algunos autoantígenos de las células cancerígenas también pueden inducir inmunidad antitumoral (15).

Por otro lado, la adyuvancia puede ser inducida por las células cancerosas por la emisión de DAMPs, como el interferón (IFN), trifosfato de adenosina y calreticulina junto con las citoquinas relacionadas. Estas moléculas desempeñan un papel importante en la activación de la inmunidad adaptativa a través de la participación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Sin embargo, es importante destacar que los DAMP no pueden iniciar una respuesta inmunitaria sin un aumento de la antigenicidad en las células moribundas (15).

Por último, el microambiente tumoral determina si los linfocitos T, activados por las células dendríticas que responden a la MCI, pueden acceder al lecho tumoral para llevar a cabo una respuesta efectora y establecer memoria. Factores como la matriz extracelular (MEC), la

polarización de los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2) y los ganglios linfáticos que drenan el tumor también influyen en este proceso (15).

Tabla 1: Efecto generado en función de los factores que establecen la muerte celular inmunogénica. Tabla adaptada de: (14)

MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA				
-	+	+	+	+
ANTIGENICIDAD				
-	-	+	+	+
ADYUVANCIA				
-	+	-	+	+
MICROAMBIENTE TUMORAL				
+/-	+/-	+/-	-	+
EFECTO:				
SIN RESPUESTA	INFLAMACIÓN	TOLERANCIA	CEBADO	EJECUCIÓN

1.2. Ciclo de Inmunidad antitumoral

El ciclo de la respuesta inmune antitumoral (Figura 5), comienza con la liberación y captura de los neoantígenos, generados durante la oncogénesis, por células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (DC). Estas células procesan los antígenos y sufren un proceso de maduración, el cual implica un aumento de la expresión de diversas moléculas, como el receptor de quimiocinas CCR7. Este proceso permite la migración de las DCs a los ganglios linfáticos, donde podrán interactuar con los linfocitos T. Para que se genere una respuesta T antitumoral, es necesario que este proceso vaya acompañado de señales que eviten la tolerancia periférica a los antígenos tumorales, como una alta expresión de moléculas MHC y moléculas coestimuladoras (como CD80, IL1, IFN- α) (16). Esto permite la presentación antigénica a través de MHC I a los linfocitos T efectoras (T CD8⁺) o MHC II a los linfocitos T cooperadores (CD4⁺) (17) lo que desencadena el cebado y la activación de las respuestas T efectoras dirigidas contra estos antígenos. En este punto, el equilibrio entre los linfocitos T reguladores (Treg) y los linfocitos T efectoras determina la naturaleza de la respuesta inmune y su resultado.

Los linfocitos T CD8⁺ son una población celular que puede diferenciarse en varios subgrupos en función de los estímulos ambientales que reciben, lo que afecta su función. El subgrupo más estudiado y relevante es la subpoblación de linfocitos T CD8 citotóxicos, también conocidos como Tc1 (18). Este subgrupo es capaz de reconocer y unirse mediante la interacción de su TCR con el antígeno afín unido a MHC I, lo que conduce a la eliminación de las células tumorales mediante: exocitosis sináptica de gránulos compuestos por granzimas y perforinas conocida como “el beso de la muerte”, o indirectamente mediante la secreción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) o el interferón gamma (IFN γ) (19). La muerte de estas células libera más antígenos tumorales, lo que retroalimenta positivamente la respuesta antitumoral en ciclos sucesivos (16).

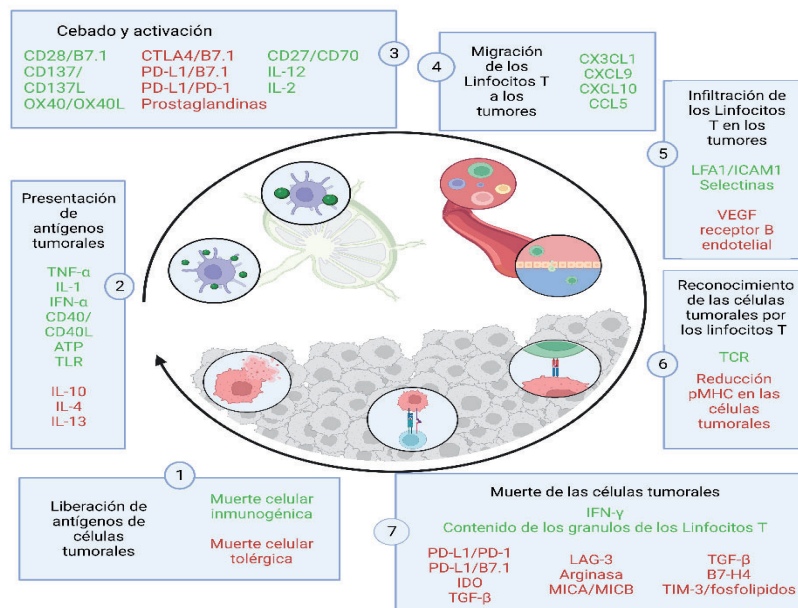


Figura 5. Ciclo de la respuesta inmune antitumoral. En esta figura se observa los diferentes pasos que forman el ciclo de la inmunidad tumoral junto a los factores que estimulan (en verde) o inhiben (en rojo) la muerte de las células tumorales. Adaptado de: (16).

1.3. Evasión de la respuesta inmune por parte de los tumores

En la actualidad, es evidente que el sistema inmunitario puede defenderse y atacar a las células tumorales. Sin embargo, la alta prevalencia, recaídas y defunciones nos indica que esta respuesta inmunitaria a menudo es ineficaz. Es por ello, que se reconoce que muchos tumores tienen la capacidad de evadir el sistema inmunológico del huésped, lo que se considera una característica biológica distintiva de estos. En consecuencia, uno de los mayores objetivos de la inmunología es comprender estos mecanismos con el fin de neutralizarlos y así detener el crecimiento tumoral (20).

Las células tumorales generalmente emplean mecanismos adicionales para promover la tolerancia inmunitaria a lo que se denomina mecanismos de escape de tumor. Uno de estos mecanismos es la inhibición de los puntos de control inmunitarios. Estos puntos de control son moléculas que normalmente regulan la respuesta inmunitaria y previenen la autoinmunidad. Sin embargo, los tumores aprovechan la propia expresión de estas moléculas, como CTLA-4 (proteína asociada a linfocitos T citotóxicos) y PD-1 (proteína de muerte celular programada 1), para inhibir la respuesta de los linfocitos T infiltrantes de tumor (TILs), ya que son dos grandes importantes reguladores negativos de la respuesta antitumoral. CTLA-4 es una proteína inhibidora expresada en la superficie de los linfocitos T activados. Cuando estos son activados, CTLA-4 se transloca a la superficie celular y se une a las moléculas B7 (CD80/CD86) presentes en las células presentadoras de antígenos (APC). Esta interacción inhibe la activación y proliferación descontrolada de los linfocitos T, limitando así la respuesta inmunitaria. Por otro lado, PD-1 es

una proteína inhibitoria expresada en la superficie de varios tipos de células inmunes incluyendo los linfocitos T. PD-1 se une a sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, que se encuentran en las células presentadoras de antígenos inhibiendo la activación y función efectora de los linfocitos T. Esto evita una respuesta inmunitaria exagerada y el daño autoinmune. El problema es que las células tumorales pueden tener la capacidad de expresar tanto CTLA-4 como PD-L1 inhibiendo la respuesta antitumoral (20).

La secreción de moléculas que suprimen la respuesta antitumoral genera un perfil inmunosupresor en el microambiente tumoral (Figura 6) promoviendo escape tumoral. Dos de estas moléculas son: el factor de crecimiento transformador beta (TGF-B) y la interleucina 10 (IL-10), las cuales desempeñan múltiples funciones inmunosupresoras. Estas citoquinas inhiben la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos (B y T), así como de macrófagos, limitando su capacidad para reconocer y eliminar las células tumorales. Además, activan a los linfocitos T reguladores (Treg) contribuyendo así al mantenimiento de un perfil tolerogénico. Asimismo, estas moléculas promueven la diferenciación y acumulación de células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC) en la médula ósea, los tejidos linfoides y en el microambiente tumoral. Estas células supresoras inhiben las respuestas inmunitarias antitumorales innatas y mediadas por los linfocitos T mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras. Además, estas citoquinas poseen la capacidad de modular el microambiente tumoral al disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias, creando un entorno favorable para el crecimiento y evasión del tumor (20).

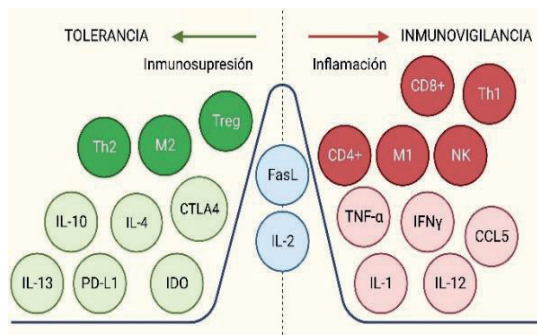


Figura 6: Moléculas y subgrupos celulares implicados en la inducción de un ambiente inmunosupresor o respuesta inmune activa. Se observan las distintas moléculas que intervienen fomentando un ambiente tolerante (verde) o inmunogénico (rojo). En azul se encuentran las moléculas que pueden pertenecer a ambos grupos dependiendo del ambiente en el que se encuentren. Para ver la función de las respectivas moléculas ver anexo B

Por último, la pérdida de la expresión de antígenos tumorales. Esto puede ser debido a la elevada tasa mitótica de las células tumorales y su inestabilidad genética, ya que es común encontrar mutaciones en genes que codifican estos antígenos. Si dichos antígenos no son críticos para la supervivencia o mantenimiento del fenotipo de la célula transformada, esta pasara desapercibidas para el sistema inmune. Además, se observa una disminución de la expresión de MHC-I, impidiendo el reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T CD8+. Esto puede deberse a una disminución en la síntesis del complejo MHC-I o alteraciones en los componentes implicados en el procesamiento del antígeno como TAP1, TAP2 o las subunidades del proteasoma (20).

Por tanto, todos estos mecanismos de escape de tumor permiten a las células cancerosas evadir la vigilancia inmunológica y desarrollar estrategias para sobrevivir y crecer sin ser atacadas por el sistema inmunológico.

2. La inmunoterapia oncológica

El término ‘inmunoterapia oncológica’ se refiere a cualquier tipo de tratamiento basado en estimular y utilizar el sistema inmunológico del propio paciente para atacar el cáncer o bloquear las vías de inhibición o escape de El término ‘inmunoterapia oncológica’ se refiere a cualquier tipo de tratamiento basado en estimular y utilizar el sistema inmunológico propio del paciente para atacar el cáncer o bloquear las vías de inhibición o escape de éste (21). Echando la vista atrás, los primeros intentos de modular el sistema inmunológico para tratar el cáncer se atribuyen a los médicos alemanes Fehleisen y Busch, quienes observaron una regresión tumoral significativa tras una infección (22). Más tarde, William Bradley Coley, conocido como el padre de la Inmunoterapia, intentó aprovechar la respuesta inmunitaria para tratar sarcomas en 1891 (23,24). Sin embargo, sus logros pasaron desapercibidos hasta medio siglo después cuando se realizaron varios descubrimientos fundamentales en el campo de la inmunología relacionados con la existencia T y función de los linfocitos, se produjo una expansión en el estudio de la inmunoterapia abriendo una nueva era en los tratamientos oncológicos. Gracias a estas terapias, se ha logrado una respuesta duradera y exitosa en pacientes con cánceres avanzados (25) .

En la actualidad existen una amplia variedad de inmunoterapias disponibles (figura 7), siendo los anticuerpos monoclonales (mAbs, siglas en inglés) y la transferencia adoptiva de células T (ACT) las bases de la terapia CAR-T.

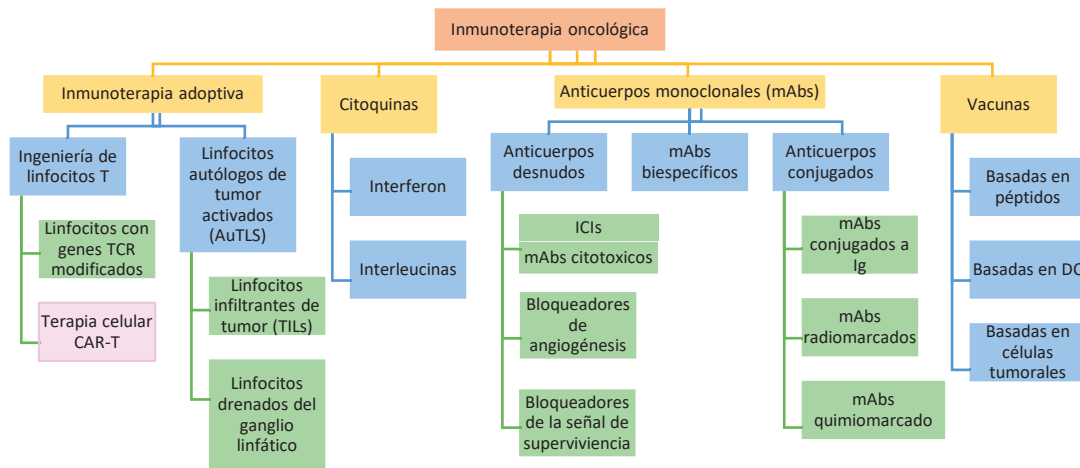


Figura 7: Enfoques actuales en el campo de la inmunoterapia frente al cáncer. TCR: Receptor de linfocitos T, CAR-T: receptor de antígenos quimérico de linfocitos T, DC: células dendríticas, Ig: inmunoglobulina, ICIs: inhibidores de punto de control inmunitario. Adaptada de: (26).

2.1. Anticuerpos monoclonales moduladores

Los anticuerpos monoclonales (mAB) son proteínas diseñadas *in vitro* para imitar la función de los anticuerpos naturales. Tienen dos principales características: se denominan ‘mono’ porque están diseñados para reconocer solo un tipo específico de antígeno y ‘clonal’ porque se pueden multiplicar *in vitro* para obtener una dosis terapéutica clínicamente eficaz (25) con una población ilimitada del mismo anticuerpo sin diferencias entre lotes de producción.

La caracterización de antígenos asociados o específico de tumor nos permite generar mAB específicos contra ellos, impidiendo que dicho antígeno se adhiera a su receptor en la superficie de la célula o marcando el antígeno para su destrucción mediante citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) o citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). El mayor obstáculo es la identificación de los antígenos de las células cancerígenas que puedan ser atacados sin dañar los tejidos sanos (25).

El primer mAB aprobado por la FDA en 1997 para tratar el cáncer, específicamente el linfoma No-Hodgkin, fue Rituxinab (27) el cual se une de manera específica a la molécula CD20+ produciendo la depleción de las células B CD20+ (28).

Hoy en día la terapia con anticuerpos monoclonales más usada consiste en la modulación de los puntos de control inmunitario, (ICIs, del inglés *immune checkpoint inhibitors*), particularmente CTL-4, PD-1 y sus ligandos (PD-L1, PD-L2)(29). Siguiendo esta estrategia la FDA ha aprobado tres categorías diferentes de ICIs. Estos son inhibidores de PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab y Cemiplimab), inhibidores de PDL-1 (Atezolimumab, Avelumab y Durvalumab) e inhibidores de CTLA-4 (Ipilimumab) (30).

2.2. Transferencia adoptiva de Células T (ACT)

La transferencia adoptiva de células T (ACT, del inglés *‘adoptive T cell transfer’*) es una terapia altamente personalizada que busca inducir una potente respuesta antitumoral, directa o indirectamente, a través de la infusión de linfocitos T inmunológicamente activos tras ser manipulados *ex vivo* e *in vitro*(21).

Existen diferentes fuentes de obtención de estas células: células madre diferenciadas *in vitro*, donantes compatibles (trasplante alogénico) y del propio paciente (trasplante autólogo) (31). Esta última opción es la vía preferente porque se evita el rechazo o la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). El trasplante autólogo se puede dividir en dos estrategias principales como se puede observar en la figura 8.

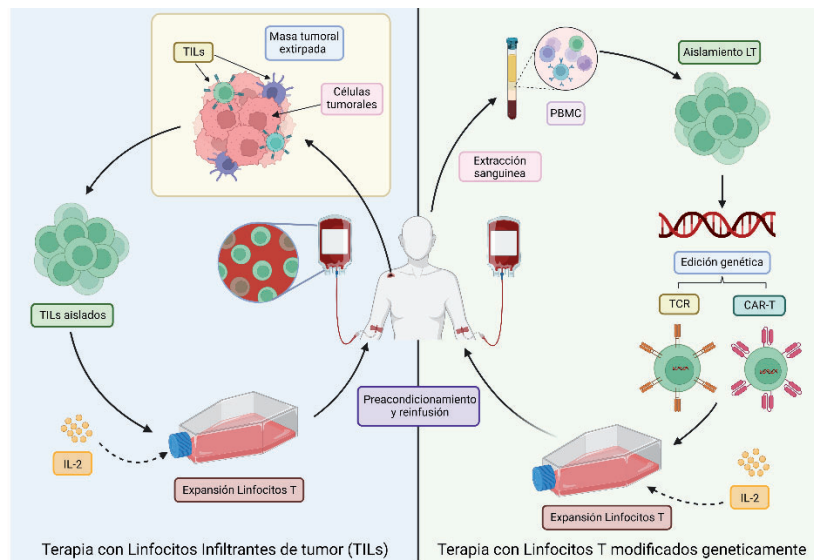


Figura 8: Diferentes estrategias de Transferencia adoptiva de células T (ACT) para el tratamiento frente al cáncer. Abreviaturas: LT: linfocitos T, TILs: linfocitos T infiltrantes de tumor, PMBC: Células mononucleares de sangre periférica. Adaptada de: (21)

La primera aproximación a este campo fue en 1980 cuando se describió por primera vez la técnica para la generación de células linfoides humanas con la capacidad de lisar células tumorales evitando las células sanas. Esto se logró incubando linfocitos de sangre periférica (PBL) en presencia de Interleucina-2 (IL-2), lo que se denominó células asesinas activadas por linfoquina (LAKs). Estas células una vez activadas se reinfundieron al paciente, quien también recibió una gran dosis de IL-2. Sin embargo, a pesar de los resultados positivos, se observó que un gran número de pacientes experimentaron toxicidades asociadas a las altas dosis de IL-2 requeridas para lograr una respuesta antitumoral eficaz (21).

En 1982 se originó la terapia con linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), grupo heterogéneo de linfocitos (T y NK) (21) con la capacidad de reconocer y atacar células cancerígenas de forma natural, por lo que les convierte en las células efectoras más efectivas del sistema inmune para combatir el cáncer (32). Los TILs reconocen antígenos asociados a tumores (AATs) a través del receptor endógeno de linfocitos T (TCR)(21), pero el principal inconveniente es el número limitado de linfocitos disponibles, además su obtención es costosa, larga (6-8 semanas) y difícil de estandarizar (33).

3. ¿Qué es un linfocito T transducido con receptor de antígeno quimérico (CAR-T)?

Basándonos en los tipos de inmunoterapia descritos anteriormente, los receptores de antígenos quiméricos (CAR, del inglés *Chimeric antigen receptor*) han surgido como una tecnología prometedora en el tratamiento del cáncer. Estas proteínas sintéticas están diseñadas para ser expresadas en la superficie de las células citotóxicas del sistema inmunológico (IECS),

con el fin de mejorar el reconocimiento y la destrucción de células específicas, incluyendo las tumorales (34).

Un ejemplo del uso de los receptores de antígenos quiméricos son los linfocitos CAR-T (“Chimeric Antigen Receptor T-Cell”). Estos son linfocitos T están modificados genéticamente para expresar en su superficie celular el receptor sintético. Este receptor les confiere la capacidad de reconocer y atacar de forma específica las células cancerígenas al dirigirse a antígenos tumorales específicos (35). Este proceso combina las propiedades citotóxicas propias del linfocito T con la especificidad proporcionada por un dominio de reconocimiento de alta afinidad, generalmente derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb) (36).

3.1. Estructura de los receptores de antígenos quiméricos

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) se componen de cuatro dominios distintos: el ectodominio o dominio extracelular, el dominio bisagra, el dominio transmembrana y el endodominio o dominio de señalización intracelular (37). Cada uno de estos dominios desempeña un papel importante en la función del receptor y, por tanto, la composición precisa de cada dominio es crucial para su correcto funcionamiento (38–40).

3.1.1. Ectodominio

El dominio extracelular o ectodominio (ECD) desempeña un papel fundamental en la especificidad del antígeno diana dado que contiene el anticuerpo responsable del reconocimiento del antígeno.

Está formado a partir del fragmento variable monocatenario (ScFv) que consta de una cadena pesada y otra ligera, de una inmunoglobulina, fusionadas mediante un péptido espaciador de longitud aproximada de 15 residuos (41). Este dominio forma parte de un anticuerpo sintético con mayor afinidad por el pMHC (péptido MHC) en comparación con el TCR (42). El dominio scFv permite reconocer antígenos específicos de la superficie celular, incluyendo proteínas, glicoproteínas, carbohidratos, entre otros (43). Esto amplía el alcance de los CAR-T más allá de las dianas de péptidos-MHC restringidas al TCR ya que las células CAR-T tienen la capacidad de reconocer antígenos de superficie de las células tumorales sin la necesidad de que estos estén presentados por el complejo MHC, lo que les permite reconocer una amplia variedad de dianas en las células tumorales sin verse afectadas por la pérdida de expresión del MHC.

Se debe destacar que, aunque el fragmento scFv al unirse al antígeno desencadena una señal de activación a través del endodominio, activando las cascadas de señalización, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual ocurre esto.

En los últimos años, han surgido nuevas alternativas al uso del dominio scFv como dominio principal de interacción con la diana. Entre estas alternativas, se encuentran los nanocuerpos, (también llamados anticuerpos VHH). Estos derivan del dominio variable de la cadena pesada de los anticuerpos (HcAbs) por tanto presentan diversas ventajas frente a los scFv tradicionales (44) como una menor inmunogenicidad debido a la ausencia de péptidos de unión sintéticos y la eliminación del origen murino del scFv (39). Además, mantienen la capacidad de unión y la especificidad similar a los scFvs tradicionales incluso en ausencia de la cadena ligera variable y los dominios constantes (45). Los nanocuerpos también evitan la autoagregación del dominio scFv, lo que previene el agotamiento prematuro e independiente del antígeno de los CAR-T, que puede ser causada por la exposición de residuos hidrofóbicos en ambas cadenas variables (46).

Otra alternativa son las cadenas duales. Utilizan el dominio de unión a anticuerpos en su forma natural de heterodímero, ya que consisten en la expresión simultánea de la cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina, unidas por enlaces disulfuro endógenos con su región constante. Esta estructura mejora la estabilidad del receptor y evita la agrupación independiente del antígeno al igual que los nanocuerpos (47).

Además de estos, se han desarrollado receptores nativos y receptores basados en ligandos como alternativas a este dominio. Estas alternativas reducen la inmunogenicidad debido a su menor tamaño, disminuyendo el riesgo de desencadenar una respuesta inmune adversa frente al T-CAR, generando una mayor persistencia de las CAR-T (34).

3.1.2. Bisagras y dominio transmembrana

El ectodominio se conecta al dominio transmembrana a través de un espaciador conocido como bisagra. Este espaciador suele derivar de la fracción constante (Fc) de la subfamilia de inmunoglobulinas IgG (IgG1 o IgG4, principalmente), IgD o el dominio CD8 (48). Aunque se ha investigado poco sobre este componente, desempeña un papel importante en la activación de los Linfocitos T-CAR, ya que el diseño del espaciador puede modular las distancias de las hendiduras sinápticas, proporcionar flexibilidad (eliminando impedimentos estéricos) y promover la dimerización (aumentando la fuerza de la señal de activación), además de reducir las respuestas inmunitarias innatas no específicas(49). También se ha observado que algunos péptidos derivados de IgG pueden interactuar con los receptores Fc γ (Fc γ R), lo que conlleva la depleción de las células CAR-T y a una disminución de la persistencia *in vivo*. Por ello se están llevando a cabo diversas investigaciones para optimizar este dominio a través de mutaciones puntuales que impidan estas interacciones (50)

Por otro lado, el dominio transmembrana se encuentra entre el dominio bisagra y el endodominio, y actúa como punto de anclaje para la transducción de señales de reconocimiento

de ligandos al dominio intracelular. Este dominio suele derivar de moléculas CD3- ζ , CD4, CD8, ICOS o CD28. Aunque los dominios transmembrana solían considerarse enlaces estructurales sin mayor interés, ahora se sabe que tienen la capacidad de influir en la función efectora de los CAR-T (38). Por ejemplo, los CAR que contienen el dominio transmembrana CD28 tienden a ser más estables que aquellos con CD3- ζ , pero este último puede dimerizar y facilitar la activación de los CAR-T. Además, el dominio CD8 libera menos IFN γ y TNF y es menos susceptible a la muerte celular inducida por activación (AICD) que aquellos que derivan de CD28 (51)

3.1.3. Dominio intracelular o endodominio

El dominio intracelular o endodominio consiste en la cadena zeta del receptor inmunoglobulina del TCR (TCR CD3 ζ) ((41) o, en su defecto, el dominio de señalización intracelular de otra proteína que contenga un motivo de activación basado en la tirosina del receptor inmunitario [ITAM]; el cual es suficiente para inducir la activación del linfocito T en función del antígeno (52). Sin embargo, como la activación de estas células modificadas genéticamente depende de la IL-2 exógena, los estudios *in vivo* han demostrado una menor expansión, estabilidad y actividad antitumoral de las células T-CAR, ya que carecen de interacción con receptores coestimuladores. Para abordar estas limitaciones, se han desarrollado las siguientes generaciones de CAR (figura 9) (53).

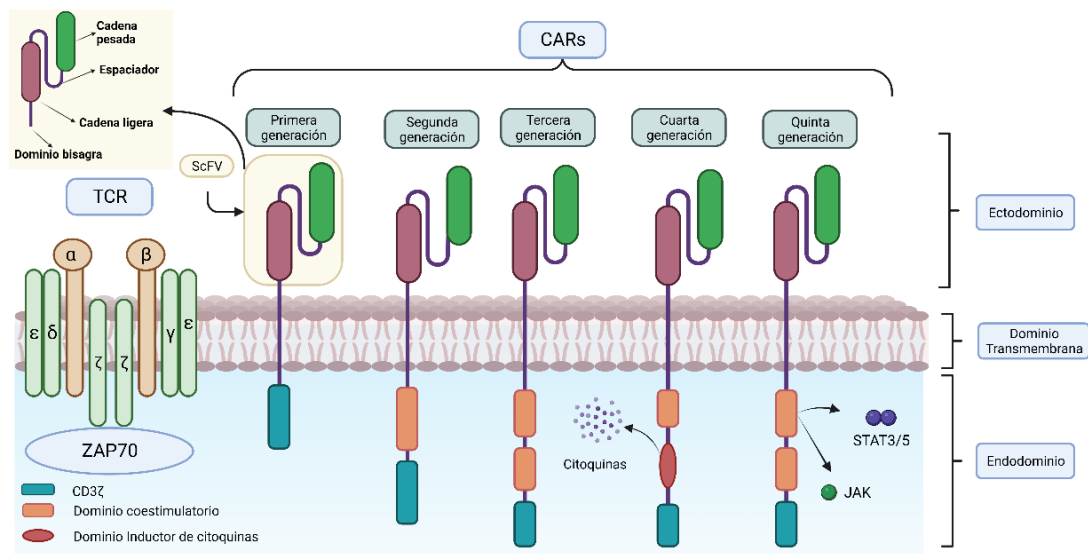


Figura 9: Representación de la estructura de las distintas generaciones de CAR. En esta figura se observan las principales diferencias en la estructura de las distintas generaciones de los receptores quiméricos de antígenos (CAR) junto a la estructura del TCR.

En los CAR de 2ª generación se añade un único dominio de coestimulación, como CD28 o 4-1BB, entre el dominio transmembrana y el CD3 ζ (34). El dominio CD28, activa la ruta de señalización a través de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), lo que induce la proliferación masiva de linfocitos T y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-2,

mejorando la persistencia y duración de las células T-CAR *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, 4-1BB (CD137), activa las vías de señalización del factor nuclear NK-KB, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK/ERK) (54,55) Actualmente se utilizan en terapias clínicamente aprobadas como Kymriah® y Yescarta®.

Los CAR de tercera generación se caracterizan por la incorporación de dos dominios coestimulatorios simultáneamente, que pueden ser una combinación de CD28, ICOS (promueven la polarización Th17), OX40 y 4-1BB. Esta estrategia permite lograr una mayor eficacia terapéutica en comparación con las generaciones anteriores, ya que se observa una mayor persistencia, menor diferenciación y agotamiento (56). La utilización combinada de estos dominios coestimulatorios ha demostrado ser altamente efectiva en la eliminación de células cancerígenas (49,56).

Los TRUCKs (linfocitos T redirigidos por CAR para la destrucción universal por citoquinas) representan la cuarta generación. Estos linfocitos derivan de la tercera generación y se utilizan como vehículos para producir y liberar citoquinas proinflamatorias específicas con el fin de superar la supresión generada por el microambiente tumoral, reclutar otras células del sistema inmune y activar la respuesta antitumoral (57). Estas citoquinas son: IL-12, que mejora la viabilidad de las células T, recluta y activa otras células del SI para mejorar la potencia y la seguridad ((58), así como IL-15, IL-18, CCL19 e IL-7. Esta liberación puede producirse de forma constitutiva o inducida, por ejemplo, mediante el factor nuclear de activación de linfocitos T (NFAT) cuando el linfocito T es activado por el CAR en el tejido diana (26,59).

La quinta generación de CAR incluye un dominio truncado de la cadena beta del receptor de IL-2 citoplasmático con un sitio de unión al factor de transcripción STAT3. De esta manera, cuando el linfocito es activado a través del CAR, este receptor activa de forma simultánea al TCR, a través de CD3 ζ , CD28 y la vía de señalización JAK-STAT3/5, utilizando las tres vías de activación fisiológicas intrínsecas de los linfocitos T. Al ser la más reciente todavía se está investigando su eficacia y seguridad (60)

En los diseños CAR de segunda generación y posteriores, se ha descubierto que el orden de los dominios coestimuladores influye en la función efectora de los CAR-T. Por ejemplo, se realizó un ensayo para estudiar las diferencias funcionales entre CAR CD28-CD3 ζ y los CAR CD3 ζ -CD28 descubriendo que la primera conformación secretaba niveles más altos de IL-2 y exhibía una actividad sostenida en el tiempo. Actualmente, aún está por determinar la combinación óptima de los diferentes dominios para lograr la mayor eficacia del CAR-T contra el antígeno diana. La personalización de estos dominios (figura 10) puede ser una estrategia clave para optimizar la función de estas células y dirigirlas de forma efectiva frente al tumor en función

del resultado deseado. Con todo esto se puede obtener una terapia más personalizada e individualizada (49).

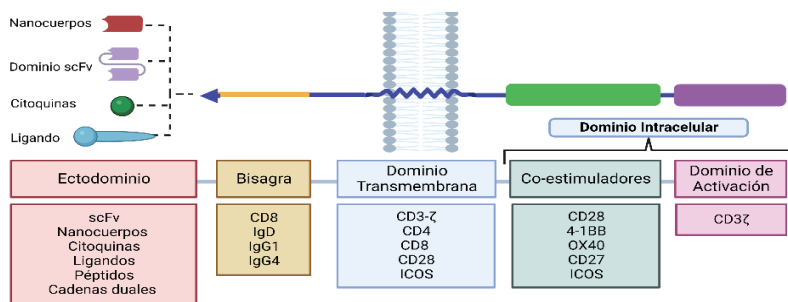


Figura 10: Plano de diseño de los diferentes CAR. Se observan los distintos componentes utilizados para cada dominio que conforman el CAR. Adaptada de: (51)

3.2. Generación y manufactura de linfocitos CAR-T a gran escala de grado clínico

Para lograr el éxito de la terapia con CAR-T, es crucial asegurar una adecuada transducción y expansión de las células del paciente. Esto es especialmente importante en pacientes que han recibido tratamientos previos, como quimioterapia, que pueden comprometer su sistema inmunológico y dificultar la expansión de las CAR-T necesarias para la terapia (61)

El proceso (figura 11) comienza con una leucoferesis de sangre periférica, que implica la separación de los leucocitos del resto de los componentes de la sangre. A continuación, se realiza una selección positiva de los linfocitos T mediante el uso de microperlas magnéticas recubiertas con anticuerpos antiCD4 y antiCD8, lo que permite eliminar células inhibitoras y contaminantes de la terapia (61). Posteriormente, son activados de manera sostenida *in vitro* durante 48h con anticuerpos anti-CD3/CD28 humanizados conjugados con una nanomatriz polimérica coloidal (62) Este proceso se lleva a cabo en presencia de un coctel de citoquinas, que puede variar según el estudio, y puede incluir IL-2 o IL-7/IL-15 (63).

Una vez activados, los linfocitos T obtenidos se modifican mediante la estrategia de transducción que generalmente implica el uso de vectores retrovirales o lentivirales, o el sistema transposón/transposasa (64) y se expanden en un sistema de cultivo cerrado, como bolsas de cultivo (35%), matraces T (22%) o biorreactores (43%) entre 7-11 días. A lo largo de los años, se ha evolucionado desde cultivos estáticos manuales a utilizar biorreactores cerrados y automáticos como el ClinicMACS Prodigy (61). Durante la expansión se obtiene un producto mixto formado por CAR+ y CAR-, con una proporción variable de CD4 y CD8 y un fenotipo más efector, indiferenciado o de memoria dependiendo del material de partida. Por último, se realizan los análisis pertinentes de control como inmunológicos, microbiológicos y de caracterización, para catalogar el producto como apto para uso clínico bajo las buenas prácticas de fabricación (64) y una vez aceptado, el producto será inyectado al paciente.

Durante ese periodo de producción, el paciente se somete a linfodepleción mediante quimioterapia (ciclofosfamida/fludarabina). Esto aumenta la probabilidad de tener una respuesta

duradera, ya que favorece la expansión *in vivo* de los CAR-T administrados, además de eliminar los linfocitos T reguladores (Treg) que pueden comprometer la terapia (65)

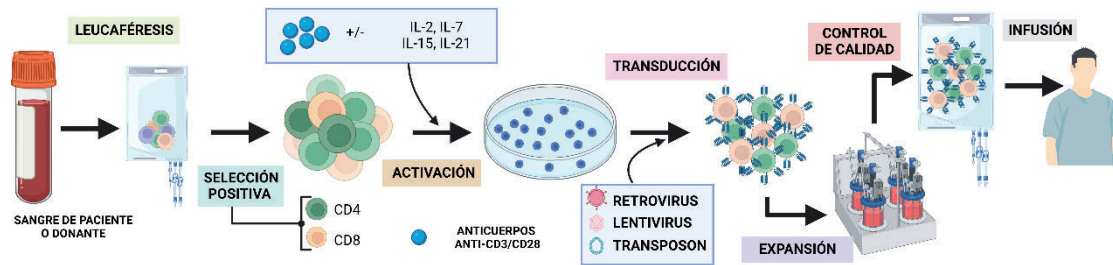


Figura 11: Generación de CAR-T de grado GMP. Adaptada de: (66)

3.2.1. Determinación y selección del antígeno diana

Actualmente, uno de los principales desafíos para el desarrollo de las terapias con CAR-T es la identificación del antígeno diana adecuado y específico para cada tipo de cáncer, ya que la selección de estos antígenos tiene un impacto significativo en la especificidad, eficacia y toxicidad, determinando su éxito (67,68).

El antígeno diana debe de cumplir con ciertos requisitos. En primer lugar, debe estar ausente en tejido sano o, si se encuentra en dicho tejido, este debe tolerar la actividad citotóxica de los CAR-T. En este sentido se distinguen dos tipos de antígenos: antígenos asociados a tumor (AAT) y los antígenos específicos de tumor (TSA). Los AAT son moléculas que se expresan selectiva o aberrantemente en células cancerígenas, generalmente en niveles mucho más altos que las células normales. Además, muchos de estos antígenos son inmunogénicos, convirtiéndolos así en dianas potenciales. Estos antígenos son fáciles de identificar y compartidos por muchos pacientes, pero atacarlos supone un mayor riesgo de efectos graves debido a su baja especificidad, lo que puede resultar en toxicidad “*off-tumor on-target*”. Por ejemplo, las células CAR-T dirigidas a HER2 pueden causar dificultad respiratoria y paro cardíaco debido a la presencia de células normales que expresan este antígeno(69). En el anexo A se listan los principales antígenos utilizados como diana, así como las neoplasias y tejidos sanos en los que también están presentes y por lo tanto son susceptibles a la acción citotóxica de los CAR-T.

Por lo contrario, los TSA son péptidos disfuncionales derivados de mutaciones somáticas no sinónimas, como variaciones de un solo nucleótido (SNP), deleciones e inserciones, ente otras. Solo se expresan en células tumorales, lo que reduce el riesgo de efectos fuera del tumor (68). Aunque los TSA son el objetivo ideal en la mayoría de las inmunoterapias, la mayoría de las CAR-T están dirigidas hacia los AAT, debido a la baja frecuencia de estas mutaciones específicas. Además, la identificación de estas mutaciones a nivel transcriptómico o proteómico y la generación de CAR-T específicas para cada paciente es costoso (70).

Por otro lado, el antígeno diana debe expresarse en la superficie celular. A diferencia de los linfocitos T naturales, los CAR-T tienen la capacidad de reconocer los antígenos sin la necesidad de que estén presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que amplía el espectro de dianas potenciales que los linfocitos T naturales.

El antígeno debe de ser esencial para la supervivencia o el crecimiento de las células tumorales, de lo contrario, la inmunoección podría favorecer la proliferación de clones tumorales que carecen del antígeno diana, lo que resultaría en escape tumoral.

Por todo ello, el ideal sería caracterizar un antígeno específico de tumor, no presente en ningún otro tejido sano y sea vital para la supervivencia del tumor, además de estar expresado en la superficie celular. Si bien esto puede ser una limitación cabe destacar que los CAR pueden reconocer distintas estructuras en las que se encuentran proteínas, carbohidratos y glucolípidos entre otras, aumentando el conjunto de antígenos disponibles.

3.2.2. Elección del vector

La modificación de los linfocitos requiere de herramientas de ingeniería genética eficaces y seguras que sean capaces de introducir el material genético de interés en el propio linfocito ya sea *ex vivo* o *in vivo*. Para introducir el gen que codificará el receptor CAR dentro del linfocito T e inducir su expresión en la membrana celular, existen distintas estrategias, las cuales describiremos a continuación:

3.2.2.1. Virales

Los vectores virales utilizan la capacidad natural de los virus para introducir el material genético en las células que infectan. Estos virus son modificados para que en lugar de su material genético introduzcan el gen de interés eliminando los genes de virulencia.

En este ámbito los más utilizados son los vectores retrovirales (95% de todos los productos fabricados(63)). Estos vectores requieren la formación de partículas virales que contengan el plásmido de transferencia que codifica el transgén flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR) y la señal de encapsidación Ψ (psi) (71). Dentro de estos vectores, destacan los vectores lentivirales (VLs) derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y los vectores gammaretrovirales, derivados del virus de la leucemia murina de Moloney o del virus de células murinas (72).

La generación de la partícula viral retroviral implica la introducción de genes básicos requeridos para la supervivencia y función, como *Gag* (proteínas estructurales), *Pol*, (enzimas para la transcripción inversa y la integración en el genoma del huésped), *Env*, (glicoproteína de la envuelta viral), además del gen de interés (GOI). Estos genes se encuentran separados en plásmidos, incluyendo el plásmido de la envuelta, empaquetamiento y el vector de interés. Para

ello, se utilizan células empaquetadoras que actúan como “fábricas de partículas virales”, ensamblando los diferentes componentes del vector y aportando la membrana del virus (72).

La integración del ADN en el genoma se logra mediante la acción de la transcriptasa inversa y la integrasa, lo que permite la transducción estable del linfocitos T y su linaje. Esto resulta en la expresión a largo plazo del transgén en los linfocitos capaces de sobrevivir a largo plazo, convirtiendo a los CAR-T en “fármacos vivos” (71).

Es importante tener en cuenta que la integración del transgén en el genoma conlleva el riesgo de oncogénesis. Los lentivirus tienen preferencia por regiones transcripcionalmente activas, lo que puede interrumpir la expresión génica o inactivar genes supresores de tumores. Por otro lado, los gammavirus se integran preferentemente en sitios de inicio de la transcripción, lo que aumenta el riesgo de expresión de oncogenes. Sin embargo, se ha observado que los linfocitos T tienen una baja susceptibilidad a la transformación, considerando que la transfección con vectores virales es segura a largo plazo. Sin embargo, los vectores virales pueden desencadenar una respuesta inmunitaria contra los epítomos codificados por el vector, lo que puede limitar la eficacia y la persistencia de las células transducidas (71), por lo que se debe seguir optimizando el sistema.

.3.2.2.2. No virales

Como alternativa a la transducción viral, surgió la electrotransfección, técnica que consiste en la creación de poros en la membrana citoplasmática de la célula diana mediante pulsos eléctricos, a través de los cuales se introduce el material genético de interés. No obstante, esta técnica se considera ineficiente, ya que requiere de sistemas adicionales para poder lograr una transducción estable (71).

En este sentido, han surgido sistemas basados en transposón/transposasa como “Sleeping beauty” (SB) y “piggyBac” (PB) que han demostrado una mayor eficacia en la transducción no viral. En el caso de SB, el vector consiste en dos componentes funcionales: ADN transposón, que lleva el gen de interés flanqueado por secuencias repetitivas invertidas (ITRs), y la transposasa SB, que reconoce los motivos ITR y moviliza el transgén a un sitio aceptor dentro del genoma celular. Tras ello, el gen de la transposasa se degrada evitando la genotoxicidad. Por otro lado, el vector PB consta de la transposasa PB (PBasa), en forma de ADN o ARNm, y un plásmido de transferencia separado que contiene el material genético de interés (71).

La gran ventaja de estas estrategias en comparación con los sistemas virales es su mayor capacidad de carga, aunque existe una correlación inversa entre el tamaño del inserto y la eficiencia de la transposición. Es importante tener en cuenta que estas estrategias requieren el

método de electroporación, ya que los ácidos nucleicos no pueden penetrar espontáneamente en las células diana, lo que disminuye la viabilidad celular (71).

4. Aplicaciones clínicas

4.1. Compuestos o terapias aprobadas

En 1989, se logró un hito científico importante a cargo de Gross et al., quienes lograron desarrollar el primer receptor sintético expresado en linfocitos (73) Mucho más tarde, en el año 2017, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó las dos primeras terapias basadas en CAR-T para el tratamiento del cáncer. Específicamente, se otorgó la aprobación a: Kymriah (tisagenlecleucel) y Yescarta (axicabtagene ciloleucel), que se utilizan para tratar pacientes de hasta 25 años de edad con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B refractaria o recidivante, y pacientes adultos con linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) recidivante o refractario tras dos o más líneas de terapias sistémicas (35).

Desde entonces se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la eficacia y seguridad de estas inmunoterapias en una amplia gama de tumores sólidos y hematológicos (35). Estos esfuerzos han dado lugar a la aprobación de seis productos basados en esta terapia celular, de los cuales cuatro están dirigidos al anti-clúster de diferenciación (CD19) y los dos más recientes se dirigen al antígeno de maduración de células B (BCMA) (35). Estos avances han tenido un impacto significativo en el tratamiento de enfermedades como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), neoplasias de células B y el mieloma múltiple. La tabla 1 resume los nombres comerciales, fechas de aprobación y antígenos diana de estas terapias.

Tabla 2: Terapias CAR-T aprobadas por la FDA hasta 2023

Nombre	Nombre comercial	Dominio intracelular	Año de aprobación	Antígeno	Enfermedad	Beneficio clínico
Tisagenlecleucel	Kymriah	CD3ζ 4-1BB	2017	CD19	LLA-B	TR: 81% CR: 60%
			2018		LDBG	ORR: 52% CR: 40%
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta	CD3ζ CD28	2017	CD19	LDBG	ORR: 82% CR: 54%
			2021		LF	ORR: 91% CR: 60%
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus	CD3ζ CD28	2020	CD19	LCM	ORR: 93% CR: 67%
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	CD3ζ 4-1BB	2021	CD19	LDBG	ORR: 74% CR: 52%
Idecabtagene vicleucel	Abecma	CD3ζ 4-1BB	2021	BCMA	MM	ORR: 82% CR: 39%
Ciltacabtagene autoleucel	Carvykti	CD3ζ 4-1BB	2022	BCMA	MM	ORR: 95% CR: 67%

LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda; LDBG: Linfoma difuso de células B grandes; MM: mieloma múltiple; LF: linfoma folicular; LCM: Linfoma de células del manto; CR: respuesta completa; ORR; ratio de respuesta objetiva; TR: tasa de respuesta. Todas las terapias también están aprobadas por la EMA excepto Ciltacabtagene autoleucel. Fuente adaptada de: (74,75).

4.2. Ensayos clínicos

Según los datos obtenidos, se ha encontrado que China es el país con el mayor número de ensayos clínicos registrados hoy en día, con un total de 566 ensayos clínicos en marcha, seguido de Estados Unidos. En la figura 12 se puede observar la distribución de los ensayos clínicos registrados por país.

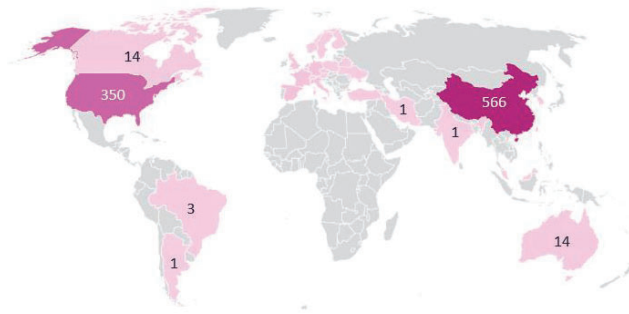


Figura 12: Distribución y número de los ensayos clínicos registrados en el mundo por país.

Además, al analizar la naturaleza de estos ensayos clínicos, se observa que la mayoría de ellos corresponden a estudios en fase 1 o estudios de fase 1/fase 2 (figura 13.1). Estos ensayos se centran en evaluar la seguridad de la terapia CAR-T y determinar la dosis adecuada de tratamiento. En los estudios de fase 1, se investiga la seguridad y tolerabilidad del tratamiento en un grupo reducido de participantes, mientras que en los estudios de fase 1/fase 2 se evalúa tanto la seguridad como la eficacia preliminar en un grupo más amplio. Estos datos sugieren que se están llevando a cabo investigaciones prometedoras en el campo de la terapia CAR-T, pero aún se encuentra en etapas tempranas de desarrollo. Adicionalmente, es relevante destacar que la mayoría de los ensayos clínicos se encuentran en estado de reclutamiento (figura 13.2).

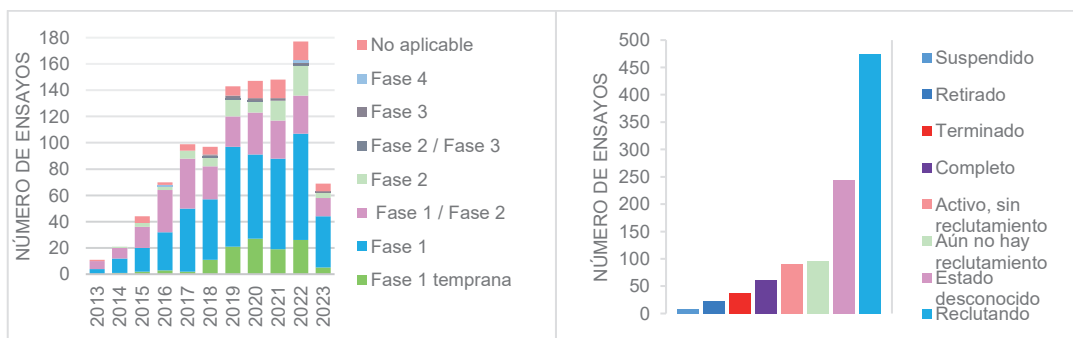


Figura 13: Estado general de los ensayos clínicos con CAR-T para el tratamiento del cáncer: 13.1: Número de ensayos por cada fase en los últimos 10 años. 13.2: Número de ensayos por estado de los ensayos clínicos.

Por otro lado, es cierto que los ensayos clínicos que utilizan CAR-T son más numerosos para los cánceres hematológicos en comparación con los que forman tumores sólidos (70% frente al 30% respectivamente) esto puede deberse a varios factores como la facilidad de encontrar marcadores de superficie celular bien definidos y específicos además de la accesibilidad del microambiente tumoral con respecto a los cánceres formadores de tumores sólidos, pero a su vez

se está viendo un crecimiento a lo largo de los años en estos últimos. En la figura 14.1 y 14.2 se muestra el desglose del número de ensayos clínicos registrados para cada tipo de cáncer, lo que brinda una visión más detallada de la distribución de la investigación en terapias CAR-T.

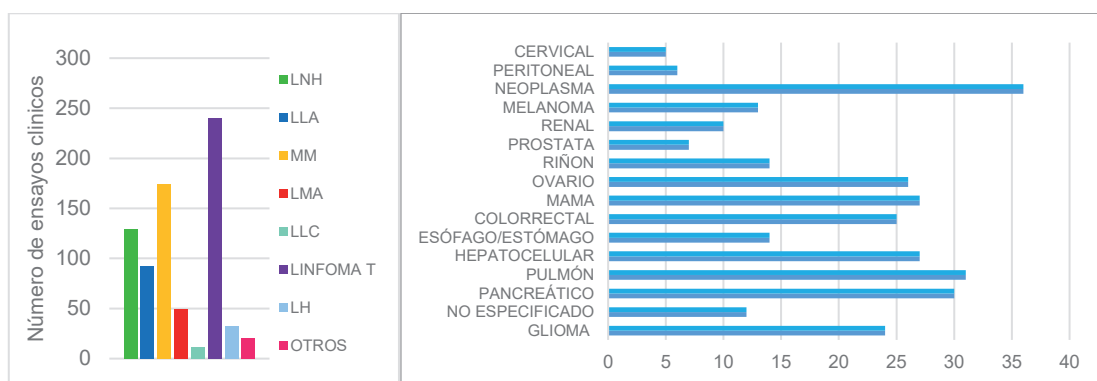


Figura 14: Número de ensayos registrados para el tratamiento de cáncer con CAR-T. 14.1: Número de ensayos clínicos para cáncer hematológico. 14.2: Número de ensayos clínicos para tumores sólidos. LNH: Linfoma No-Hodgkin, LLA: leucemia linfoblástica aguda, MM: mieloma múltiple, LMA: leucemia mieloide aguda, LLC: leucemia linfocítica crónica, LH: linfoma hodgkin.

4.2. Aplicaciones en neoplasias hematológicas

Las neoplasias hematológicas, incluyendo leucemias y linfomas, forman un grupo de enfermedades heterogéneas que proviene de la expansión clonal de células hematopoyéticas, que afectan a la sangre periférica, médula ósea u órganos linfoides secundarios. Dentro de este grupo, se encuentran los síndromes linfoproliferativos de células B, como la leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B), Leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), linfomas no hodgkins. Estas neoplasias comparten la expresión generalizada del marcador CD19, que desempeña un papel crucial en la supervivencia y proliferación de las células malignas. Por ello el CD19, es un objetivo prometedor para la inmunoterapia CAR-T, aunque eliminación debe ser controlada medicamente para evitar otros riesgos adicionales, como las infecciones (76).

4.2.1. Leucemia linfoblástica aguda-B (LLA-B), Leucemia linfocítica crónica (LLC-B) y Linfoma no Hodgkin (LNH)

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia poco frecuente siendo el 75% de los casos desarrollada a partir de los precursores de linaje de linfocitos B (LLA-B), en la que nos centraremos. La Tabla X resume las características y antígenos diana clave de la terapia de células CAR-T para la LLA-B.

Tabla 3: antígenos diana de CAR-T para el tratamiento de LLA-B junto a la estructura CAR

Antígeno diana	Estructura
CD19	CD3ζ y CD28 o CD3ζ y 4-1BB
CD22	CD3ζ y CD28

La terapia de linfocitos CAR-T dirigida al antígeno CD19 ha demostrado ser altamente efectiva en el tratamiento de la LLA-B, con tasas de remisión completa (RC) situadas entre 70-90% en pacientes pediátricos y adultos (76). Sin embargo, se han observado diferencias en los resultados dependiendo del tipo de dominio coestimulador utilizado en la construcción del CAR, por ejemplo, los pacientes tratados con 4-1BB tenían la mínima enfermedad residual (MRD) indetectable a diferencia de los pacientes tratados con construcciones con CD28 (77). Si bien las terapias CAR-T dirigidas a CD19 han producido remisiones duraderas, las toxicidades potencialmente graves han limitado su uso. Además, dado que los CAR-T dirigidos a CD19 presentan recaídas en el 10-20% debido a la pérdida del antígeno diana, se llevó a cabo otros diseños de CAR para otros antígenos diana: en el caso del ensayo realizado por Pan et al. (CD22) mostrando RC en el 70-80% de los pacientes, además de menores toxicidades relacionadas con los CAR-T CD22 (77).

Por otro lado, la leucemia linfocítica crónica (LLC), es un tipo de cáncer caracterizado por la transformación y la acumulación de células B malignas monoclonales en sangre periférica y órganos linfoides. Se ha utilizado células T-CAR anti-CD19 en pacientes con LLC, logrando remisiones completas y presencia de CAR-T en sangre durante más de 10 años. Sin embargo, estudios posteriores han mostrado una eficacia limitada, con una tasa de respuesta completa del 30%, lo cual es inferior a la observada en LLA (78).

Por último, el linfoma no-Hodkins (LNH) caracterizado por la proliferación incontrolada de linfocitos B en los ganglios linfáticos, médula ósea u otros tejidos linfoides. Los tipos más comunes de LNH incluyen el linfoma folicular (LF), así como de linfoma difuso de células B grandes (LDGB). Al igual que en los anteriores, el antígeno CD19 también es un objetivo para la terapia CAR-T. Los pacientes tratados con CAR-T anti-CD19 han mostrado remisiones duraderas entre el 33-40% de los pacientes tratados (79). Además, se han desarrollado CAR-T anti-CD20 para pacientes refractarios/recidivantes con resultados prometedores ya que 2/3 de los pacientes permanecieron libres de progresión durante 24 meses (78).

4.2.2. Mieloma Múltiple (MM)

El mieloma múltiple es una enfermedad caracterizada por la proliferación y acumulación de células plasmáticas clonales en la médula ósea con daños en otros órganos. El interés de desarrollar CAR-T para tratar el mieloma múltiple ha aumentado drásticamente en los últimos años, enfocándose en antígenos de superficie como CD19 y BMCA.

Aunque CD19 no está asociado directamente con el MM, se ha demostrado que se expresa en un subconjunto minoritario de células madre de mieloma, las cuales están asociadas con una mayor resistencia a medicamentos y son responsables de la naturaleza incurable del MM. En un

ensayo clínico realizado por Garfall y Maus et al. se logró una RC del 100%, a pesar de la ausencia de CD19 en el 99,5% de las células malignas en el único paciente tratado (80).

BMCA (antígeno de maduración de células B) es una proteína expresada en la superficie celular exclusivamente del linaje de linfocitos B (80). Actualmente se encuentran aprobadas dos terapias CAR-T anti-BMCA: Idecabtageno Vicleucel (CR: 33% y ORR:73%) y Ciltacabtagén Autoleucel (CR:67% y ORR:100%) según los resultados de los ensayos clínicos KARMMA-2 y CARTITUD-1, respectivamente. Además, se están llevando a cabo un ensayo clínico (EVOLVE) para Orvacabtagene Autoleucel, cuyos resultados iniciales sitúan la ORR en torno al 92% (81).

A pesar de estos avances recientes en el tratamiento, la recurrencia de la enfermedad sigue siendo un obstáculo importante debido a la pérdida de BMCA y la mala persistencia de los CAR-T causada por el ambiente tumoral y las células plasmáticas malignas (81).

4.3. CARs en el tratamiento de tumores sólidos

Pese al éxito de los CAR-T en las neoplasias hematológicas, su aplicación en tumores sólidos presenta desafíos adicionales que deben abordarse reduciendo su éxito (Figura 15).

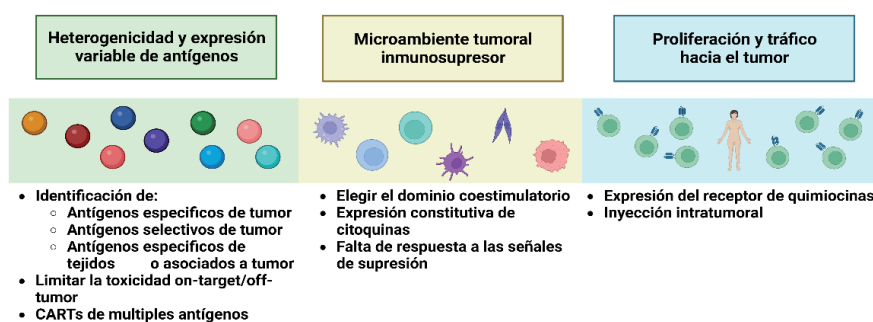


Figura 15: Desafíos principales para lograr el éxito en la terapia CAR-T para tumores sólidos.

Adaptada de: (82)

Uno de los principales desafíos es la identificación y caracterización del antígeno diana. Los tumores sólidos presentan una mayor heterogeneidad y expresión variable de antígenos tumorales específicos, como proteínas resultantes de modificaciones postranscripcionales únicas, como alteraciones de los patrones de glicosilación de MUC1, MUC16, TAG72 o B7-H3 (82). Además, los AAT son más comunes, lo que aumenta el riesgo de toxicidades fuera del tumor en el objetivo (83). Esta heterogeneidad tumoral también incluye la pérdida o la regulación negativa de la expresión del antígeno de interés fomentando la recaída del paciente (82).

La segunda limitación es el tráfico del CAR-T hacia el tumor, Los CAR-T carecen de los correspondientes receptores de quimiocinas necesarios lo que reduce su capacidad citotóxica (84). Para superar este obstáculo, se requiere el desarrollo de CAR-T de cuarta generación que expresen receptores de quimiocinas específicas que coincidan con la quimiocinas producidas por el tumor

(84). Además, en varios estudios preclínicos se observó una mayor eficacia inyectando los CAR-T directamente en el tumor (82).

Otra limitación importante es superar el ambiente inmunosupresor generado por las células tumorales y el estroma circundante. Se han realizado estudios en CAR-T de segunda generación que destacan la importancia del dominio coestimulador. Además, se están investigando enfoques que induzcan la liberación local de factores estimulantes para promover respuestas inmunitarias antitumorales, como en el caso de los TRUCKs, que representa una generación más prometedora para este tipo de tratamiento.

5. Limitaciones generales o efectos secundarios

Las principales toxicidades de las células T transducidas con CAR se dividen en dos categorías: (1) toxicidades generales, como el Síndrome de liberación de citoquinas (CRS) y neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunitarias (ICANS); y (2) toxicidades específicas debido a la interacción del CAR con antígenos expresados en células sanas, conocidas como toxicidades *off-tumor on-target*, mencionado anteriormente.

5.1. Síndrome de liberación de citoquinas (CRS)

El síndrome de liberación de citoquinas (CRS, por sus siglas en inglés “Cytokine release syndrome”) es el efecto secundario tóxico más común en la terapia con CAR-T. Por ejemplo, en CAR-T dirigidos a CD19 se ha dado en el 100% de los pacientes (85). Consta de una respuesta inflamatoria sistémica causada por el aumento significativo de citoquinas acompañada de la activación *in vivo* rápida de las CAR-T, después de la infusión inicial. La unión del dominio scFv del CAR-T al antígeno diana desencadena la proliferación y secreción de elevadas cantidades de citoquinas como IL-6, IFN- γ , IL-10 y TNF- α en un corto periodo de tiempo. A su vez diversos estudios han demostrado que IFN- γ induce la liberación de otras citoquinas como TNF α , IL-6, IL-15, IL-1 β e IL-12 manteniendo mediante retroalimentación positiva las respuestas anteriores (52). El CSR puede presentar una amplia gama de síntomas, desde leves (similar a los de la gripe) hasta graves y potencialmente mortales. Los síntomas leves incluyen fiebre, fatiga, erupción cutánea, cefalea, artralgia y mialgia, mientras que los casos graves se caracterizan por hipotensión y fiebre alta, pudiendo evolucionar hacia una respuesta sistémica inflamatoria descontrolada como shock circulatorio, coagulopatías y fallo multiorgánico, que puede resultar en la muerte. Las anomalías de laboratorio frecuentes en estos pacientes incluyen citopenias, elevación de la creatinina y de enzimas hepáticas, alteración de los parámetros de coagulación, entre otros (85).

5.2. Neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunitarias (ICANS)

ICANS se caracteriza por la interrupción de la barrera hematoencefálica y el aumento de los niveles de citoquinas en el líquido cefalorraquídeo. Los síntomas pueden variar desde

encefalopatía hasta convulsiones y en casos graves, la muerte. Los hallazgos atípicos incluyen afasia transitoria, paresia facial, mioclonía y edema cerebral potencialmente mortal. Aunque ICANS puede ocurrir de manera independiente a CRS, generalmente existe una correlación entre ambas (86) debido a la activación endotelial que desempeña un papel clave en la neurotoxicidad y permite la entrada de citoquinas proinflamatorias al sistema nervioso central (SNC) a través de la permeabilidad incrementada de la barrera hematoencefálica (BHE)(86,87).

Para evitar las toxicidades sistémicas mencionadas anteriormente y lograr una eficacia clínica óptima, es necesario alcanzar un nivel umbral de activación y secreción de citoquinas tolerable para el organismo en los CAR-T. Esto se logra mediante un correcto escalado de dosis en ensayos de fase I para cada tipo de CAR, considerando carga tumoral general, los niveles de expresión del antígeno diana y su afinidad por el ectodominio, además de los dominios coestimulatorios (51).

5.3 Estrategias de seguridad para eliminar las toxicidades generadas por los CAR-T

Se desarrollaron estrategias de seguridad para abordar las toxicidades de los CAR-T, como el uso de los genes suicidas (figura 16). Un ejemplo es la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) que fosforila análogos de nucleósidos específicos para formar un compuesto tóxico (trifosfato de GCV) que inhibe la síntesis de ADN y provoca la muerte celular. Aunque las células que expresan HSV-tk han demostrado una alta eficacia antitumoral y pueden eliminarse de forma efectiva, este enfoque tiene limitaciones como la necesidad de activación por un profármaco (ganciclovir) y un tiempo de 3 días para lograr un efecto completo *in vitro* (88). Otro sistema alternativo de gen suicida es CaspaCIDE®, que utiliza el gen de interruptor de seguridad inducible caspasa 9 (iCasp9). Este sistema permite la eliminación de CAR-T activados de forma inapropiada mediante el uso de un fármaco inductor de dimerización (CID) de molécula pequeña llamado AP1903, que promueve la apoptosis en las células transducidas. Este gen está compuesto por la porción intracelular de la proteína caspasa 9 humana fusionada con un dominio de unión a fármacos que derivada de la proteína FK506 humana. El sistema CaspaCIDE® es capaz de matar selectivamente las células que expresan altos niveles del gen suicida (89).

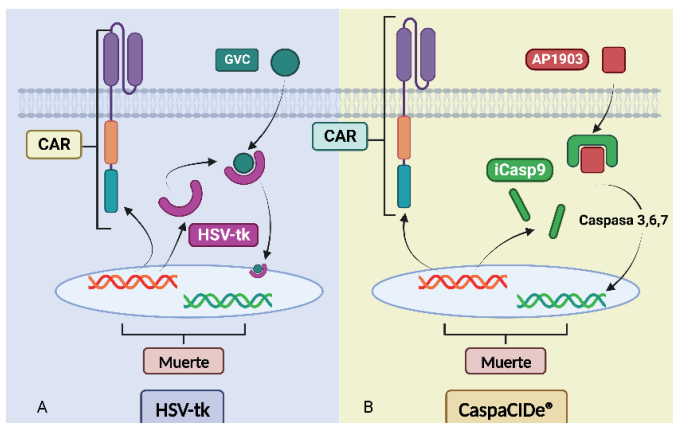


Figura 16: Sistemas de seguridad basados en genes suicidas: 16.A: sistema basado en HSV-tk. 16.B: Sistema basado en iCasp9. Adaptada de: (88)

CAPÍTULO IV: Conclusiones y perspectivas de futuro

Los linfocitos T-CAR han surgido como una innovadora y prometedora estrategia en el campo de la inmunoterapia contra el cancer, y a lo largo de esta revisión bibliográfica se ha explorado exhaustivamente el potencial terapéutico de esta terapia en el contexto del cancer, investigando su estructura, su eficacia antitumoral, efectos secundarios y producción, así como sus limitaciones y desafíos que aún persisten en su aplicación clínica. En este capítulo final se enumeran las conclusiones obtenidas en la revisión, brindando además perspectivas de futuro y recomendaciones para mejorar y potenciar la terapia de linfocitos CAR-T.

- Eficacia antitumoral: los linfocitos CAR-T han demostrado ser una estrategia prometedora en el tratamiento de ciertos tipos de cancer, especialmente en neoplasias hematológicas logrando remisiones completas del 70% en la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Sin embargo, en tumores sólidos el éxito es menor ya que habría que abordar las distintas limitaciones que presenta esta terapia, como el microambiente tumoral o la heterogeneidad antigénica mencionadas anteriormente.
- Los CAR-T tienen una alta aplicabilidad ya que se podrían utilizar en una amplia gama de tipos de cancer siempre y cuando se encuentren antígenos asociados o específicos de tumor que se expresen en la superficie celular y que su ataque no sea tóxico para el paciente.
- A pesar de los notables beneficios con respecto a la eficacia de esta terapia, hay que tener en cuenta las toxicidades asociadas como las respuestas inflamatorias sistémicas, conocidas como Síndrome de liberación de citoquinas (CRS), así como la neurotoxicidad. Estos efectos secundarios deben de ser correctamente monitorizados para no poner en riesgo la vida del paciente y así garantizar la seguridad del paciente ante la terapia.
- Hay que señalar que la terapia basada en CAR-T pueden generar respuestas duraderas en pacientes con cáncer, ya que la optimización de la estructura CAR mediante las distintas generaciones ha permitido mejorar la persistencia de estas células en el organismo y su capacidad para eliminar las células tumorales residuales, lo que contribuye así a la prolongación de la remisión y supervivencia a largo plazo. Sin embargo, se deben considerar las posibles recaídas asociadas a la pérdida del antígeno tumoral o a los mecanismos de escape del tumor.
- Enfoque a múltiples antígenos: se ha demostrado que dirigirse a antígenos individuales puede conllevar el riesgo de escape inmunitario por parte del tumor, lo que puede reducirse al dirigirse a múltiples antígenos (56), por ejemplo, se ha visto que los CAR biespecíficos HER2/IL13Ra2 (glioblastoma) y HER2/MUC1 (cáncer de mama) producen respuestas antitumorales superiores en comparación con la terapia de diana única (93,94).

Décadas de trabajo en la lucha contra el cáncer han llevado a avances significativos en la curación de tumores, pero el éxito está estrechamente relacionado con el diagnóstico temprano. En los pacientes con cáncer avanzado las tasas de remisión completa apenas han mejorado. Es importante continuar investigando y propongo las siguientes perspectivas de futuro para mejorar la terapia y lograr el éxito deseado.

- La ampliación del espectro de los antígenos disponibles para tratar los diversos tipos de cancer, para ello es necesario identificar y caracterizar con éxito el antígeno al que se quieren dirigir los linfocitos CAR-T, por ejemplo, mediante modelos informáticos (ensayos *in sillico*).
- Mejoras en la persistencia y durabilidad: para ello se están llevando a cabo varios ensayos que combinan varios tipos de tratamientos junto a la terapia CAR-T como quimioterapia, u otras inmunoterapias como los inhibidores de punto de control. Por ejemplo, La administración conjunta de quimioterapia con linfocitos CAR-T inhibe la autoinmunidad y las células inmunosupresoras para mejorar la persistencia de los CAR-T in vivo (90).
- Mejoras en la seguridad: optimizando la estructura del receptor quimérico de antígenos además de introducir elementos que ayudan a controlar la seguridad como los genes suicidas inducibles
- Un área de enfoque importante para futuras investigaciones es el estudio de la estructura del receptor quiméricos de antígenos con el objetivo de crear el constructo perfecto adaptado a cada tipo de cancer. Como hemos visto la selección adecuada de dominios coestimulatorios, la optimización de la afinidad y estabilidad, y la consideración de la especificidad de antígenos tumorales son aspectos clave. Además, la inclusión de elementos de seguridad y la combinación con otras terapias podrían potenciar aún más su efectividad. A medida que avanza la ingeniería genética y la medicina de precisión, se esperan CAR más sofisticados y específicos en el futuro, abriendo nuevas posibilidades en el tratamiento personalizado del cáncer.
- Desarrollo de un mayor número de terapias alogénicas (CAR-T universales), esto nos podría ayudar para acortar los tiempos de espera que sufre el paciente antes de recibir el tratamiento o en caso de que no tenga los suficientes linfocitos requeridos para llevar a cabo el tratamiento, pero teniendo en cuenta los riesgos de rechazo además de disminuir el costo de fabricación.

En última instancia, se espera que estas conclusiones sean un punto de partida para futuras investigaciones y desarrollos en el ámbito de la inmunoterapia contra el cáncer, con el objetivo de maximizar la eficacia, minimizar las toxicidades y ampliar el alcance de los Linfocitos T-CAR como una estrategia terapéutica innovadora y esperanzadora en la lucha contra el cáncer.

CAPÍTULO V: Bibliografía

1. Molnar C, Gair J. 6.3 Cancer and the Cell Cycle. BCcampus; 2015.
2. Medina Villaseñor E, Martínez Macías R. fundamentos-oncologia-unam.
3. Pérez-Cabeza De Vaca R, Cárdenas-Cárdenas E, Mondragón-Terán P, Argentina A, Solís EV. Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. Vol. 22, Rev Esp Méd Quir. 2017.
4. Enfermedades no transmisibles [Internet]. [cited 2023 Apr 11]. Available from: <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/MDB/noncommunicable-diseases>
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Feb 28];71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>
6. Cancer Today [Internet]. [cited 2023 Mar 8]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
7. Cáncer: qué es, síntomas y tratamiento | Top Doctors [Internet]. [cited 2023 May 31]. Available from: <https://www.topdoctors.es/diccionario-medico/cancer-tratamiento#>
8. Fedewa SA, Sauer AG, Siegel RL, Jemal A. Prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2015 Apr;24(4):637–52.
9. Podolskiy DI, Gladyshev VN. Intrinsic Versus Extrinsic Cancer Risk Factors and Aging. Trends Mol Med. 2016 Oct;22(10):833–4.
10. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2021 Sep;74(9):790–9.
11. ClinicalTrials.gov.
12. Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. Transplant Rev. 1971;7:3–25.
13. Gubin MM, Vesely MD. Cancer Immunoediting in the Era of Immunoncology. Clin Cancer Res. 2022 Sep 15;28(18):3917–28.
14. Kroemer G, Galassi C, Zitvogel L, Galluzzi L. Immunogenic cell stress and death. Nat Immunol. 2022 Apr;23(4):487–500.
15. Lin RA, Lin JK, Lin SY. Mechanisms of immunogenic cell death and immune checkpoint blockade therapy. Kaohsiung J Med Sci. 2021 Jun;37(6):448–58.
16. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013 Jul 25;39(1):1–10.
17. Chen Y, Liu R, Li C, Song Y, Liu G, Huang Q, et al. Nab-paclitaxel promotes the cancer-immunity cycle as a potential immunomodulator. Am J Cancer Res. 2021;11(7):3445–60.
18. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2014 Dec;62(6):449–58.

19. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9:14.
20. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* Vol. 9th Edition. 2017. 397–416 p.
21. Met Ö, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol.* 2019 Jan;41(1):49–58.
22. Orange M, Reuter U, Hobohm U. Coley's Lessons Remembered: Augmenting Mistletoe Therapy. *Integr Cancer Ther.* 2016 Dec;15(4):502–11.
23. Burdick CG. WILLIAM BRADLEY COLEY 1862-1936. *Ann Surg.* 1937 Jan;105(1):152–5.
24. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol.* 2020 Aug;17(8):807–21.
25. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:2965.
26. Poorebrahim M, Sadeghi S, Fakhr E, Abazari MF, Poortahmasebi V, Kheirollahi A, et al. Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019 Sep;56(6):393–419.
27. Banker DD. Monoclonal antibodies. A review. Vol. 55, *Indian Journal of Medical Sciences.* 2001. p. 651–4.
28. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther.* 2017 Oct;34(10):2232–73.
29. Marin-Acevedo JA, Soyano AE, Dholaria B, Knutson KL, Lou Y. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *J Hematol Oncol.* 2018 Jan 12;11(1):8.
30. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol.* 2022 Apr 24;29(5):3044–60.
31. Fan J, Shang D, Han B, Song J, Chen H, Yang JM. Adoptive Cell Transfer: Is it a Promising Immunotherapy for Colorectal Cancer? *Theranostics.* 2018;8(20):5784–800.
32. Gorabi AM, Hajjighasemi S, Sathyapalan T, Sahebkar A. Cell transfer-based immunotherapies in cancer: A review. *IUBMB Life.* 2020 Apr 1;72(4):790–800.
33. Wang S, Sun J, Chen K, Ma P, Lei Q, Xing S, et al. Perspectives of tumor-infiltrating lymphocyte treatment in solid tumors. *BMC Med.* 2021 Jun 11;19(1):140.
34. Hughes-Parry HE, Cross RS, Jenkins MR. The Evolving Protein Engineering in the Design of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 27;21(1).
35. Chen YJ, Abila B, Mostafa Kamel Y. CAR-T: What Is Next? *Cancers (Basel).* 2023 Jan 21;15(3).
36. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng.* 2018 Jun;2(6):377–91.
37. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res.* 2017;5:22.
38. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development

- of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev.* 2014 Jan;257(1):107–26.
39. Safarzadeh Kozani P, Naseri A, Mirarefin SMJ, Salem F, Nikbakht M, Evazi Bakhshi S, et al. Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy. *Biomark Res.* 2022 Apr 25;10(1):24.
 40. Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 14;20(6).
 41. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol.* 2019 May;94(S1):S3–9.
 42. Stone JD, Kranz DM. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies. *Front Immunol.* 2013;4:244.
 43. Gill S, Porter DL. CAR-modified anti-CD19 T cells for the treatment of B-cell malignancies: Rules of the road. Vol. 14, *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2014. p. 37–49.
 44. Bao C, Gao Q, Li LL, Han L, Zhang B, Ding Y, et al. The Application of Nanobody in CAR-T Therapy. *Biomolecules.* 2021 Feb 8;11(2).
 45. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:775–97.
 46. Sun W, Xie J, Lin H, Mi S, Li Z, Hua F, et al. A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies. *Protein Expr Purif.* 2012 May;83(1):21–9.
 47. Faitschuk E, Nagy V, Hombach AA, Abken H. A dual chain chimeric antigen receptor (CAR) in the native antibody format for targeting immune cells towards cancer cells without the need of an scFv. *Gene Ther.* 2016 Oct;23(10):718–26.
 48. Elahi R, Khosh E, Tahmasebi S, Esmaeilzadeh A. Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Front Immunol.* 2018 Jul 31;9.
 49. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine.* 2020 Aug;58:102931.
 50. Jonnalagadda M, Mardiros A, Urak R, Wang X, Hoffman LJ, Bernanke A, et al. Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol Ther.* 2015 Apr;23(4):757–68.
 51. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Mar;17(3):147–67.
 52. Zhang Q, Ping J, Huang Z, Zhang X, Zhou J, Wang G, et al. CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead. *J Immunol Res.* 2020;2020:1924379.
 53. Andrea AE, Chiron A, Mallah S, Bessoles S, Sarrabayrouse G, Hacein-Bey-Abina S. Advances in CAR-T Cell Genetic Engineering Strategies to Overcome Hurdles in Solid Tumors Treatment. *Front Immunol.* 2022 Feb 8;13.
 54. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity.* 2016 May 17;44(5):973–88.
 55. Zapata JM, Perez-Chacon G, Carr-Baena P, Martinez-Forero I,

- Azpilikueta A, Otano I, et al. CD137 (4-1BB) Signalosome: Complexity Is a Matter of TRAFs. *Front Immunol.* 2018;9:2618.
56. Nair R, Westin J. CAR T-Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1244:215–33.
 57. Cui X, Liu R, Duan L, Cao D, Zhang Q, Zhang A. CAR-T therapy: Prospects in targeting cancer stem cells. *J Cell Mol Med.* 2021 Nov;25(21):9891–904.
 58. Lin H, Cheng J, Mu W, Zhou J, Zhu L. Advances in Universal CAR-T Cell Therapy. *Front Immunol.* 2021;12:744823.
 59. Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev.* 2014 Jan;257(1):83–90.
 60. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer.* 2019 Jan;120(1):26–37.
 61. Zhang W, Jordan KR, Schulte B, Purev E. Characterization of clinical grade CD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated CliniMACS Prodigy system. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:3343–56.
 62. Abou-El-Enein M, Elsallab M, Feldman SA, Fesnak AD, Heslop HE, Marks P, et al. Scalable Manufacturing of CAR T cells for Cancer Immunotherapy. *Blood Cancer Discov.* 2021 Sep;2(5):408–22.
 63. Roddie C, O'Reilly M, Dias Alves Pinto J, Vispute K, Lowdell M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy.* 2019 Mar;21(3):327–40.
 64. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2016;3:16015.
 65. Amini L, Silbert SK, Maude SL, Nastoupil LJ, Ramos CA, Brentjens RJ, et al. Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022 May;19(5):342–55.
 66. Barrett DM, Singh N, Porter DL, Grupp SA, June CH. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med.* 2014;65:333–47.
 67. Rosenberg SA. Finding suitable targets is the major obstacle to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2014 Feb;21(2):45–7.
 68. Aparicio C, Belver M, Enríquez L, Espeso F, Núñez L, Sánchez A, et al. Cell Therapy for Colorectal Cancer: The Promise of Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 29;22(21).
 69. Zhang Y, Li Y, Cao W, Wang F, Xie X, Li Y, et al. Single-Cell Analysis of Target Antigens of CAR-T Reveals a Potential Landscape of “On-Target, Off-Tumor Toxicity”. *Front Immunol.* 2021;12:799206.
 70. Arabi F, Torabi-Rahvar M, Shariati A, Ahmadbeigi N, Naderi M. Antigenic targets of CAR T Cell Therapy. A retrospective view on clinical trials. *Exp Cell Res.* 2018 Aug 1;369(1):1–10.
 71. Moretti A, Ponzio M, Nicolette CA, Tcherepanova IY, Biondi A, Magnani CF. The Past, Present, and Future of Non-Viral CAR T Cells. *Front Immunol.* 2022;13:867013.
 72. Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia.* 2018 Jul;32(7):1529–41.
 73. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-

- type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):10024–8.
74. Pan K, Farrukh H, Chittepu VCSR, Xu H, Pan CX, Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 Mar 31;41(1):119.
 75. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet*. 2021 Jul 24;398(10297):314–24.
 76. Maude S, Barrett DM. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2016 Jan;172(1):11–22.
 77. Martino M, Alati C, Canale FA, Musuraca G, Martinelli G, Cerchione C. A Review of Clinical Outcomes of CAR T-Cell Therapies for B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 21;22(4).
 78. Todorovic Z, Todorovic D, Markovic V, Ladjevac N, Zdravkovic N, Djurdjevic P, et al. CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Curr Oncol*. 2022 May 18;29(5):3647–57.
 79. Abramson JS, Lunning M, Palomba ML. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Aggressive B-Cell Lymphomas: Current and Future State of the Art. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019 Jan;39:446–53.
 80. Ormhøj M, Bedoya F, Frigault MJ, Maus M V. CARs in the Lead Against Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017 Apr;12(2):119–25.
 81. Martino M, Canale FA, Alati C, Vincelli ID, Moscato T, Porto G, et al. CART-Cell Therapy: Recent Advances and New Evidence in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021 May 27;13(11).
 82. Alcantara M, Du Rusquec P, Romano E. Current Clinical Evidence and Potential Solutions to Increase Benefit of CAR T-Cell Therapy for Patients with Solid Tumors. *Oncoimmunology*. 2020 Jan 1;9(1).
 83. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:128.
 84. Ma S, Li X, Wang X, Cheng L, Li Z, Zhang C, et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci*. 2019;15(12):2548–60.
 85. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlößer HA, Schlaak M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*. 2018 Jun 15;6(1):56.
 86. Santomaso BD, Park JH, Salloum D, Riviere I, Flynn J, Mead E, et al. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov*. 2018 Aug;8(8):958–71.
 87. Chohan KL, Siegler EL, Kenderian SS. CAR-T Cell Therapy: the Efficacy and Toxicity Balance. *Curr Hematol Malig Rep*. 2023 Apr;18(2):9–18.
 88. Yu S, Yi M, Qin S, Wu K. Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity. *Mol Cancer*. 2019 Aug 20;18(1):125.
 89. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen

- receptor T cells. *Front Pharmacol.* 2014;5:235.
90. Al-Haideri M, Tondok SB, Safa SH, Maleki AH, Rostami S, Jalil AT, et al. CAR-T cell combination therapy: the next revolution in cancer treatment. *Cancer Cell Int.* 2022 Nov 24;22(1):365.
91. Nair R, Westin J. CAR T-Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1244:215–33.
92. Gross G, Eshhar Z. Therapeutic Potential of T Cell Chimeric Antigen Receptors (CARs) in Cancer Treatment: Counteracting Off-Tumor Toxicities for Safe CAR T Cell Therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:59–83.

Anexos

Anexo A: Antígenos asociados de tumor investigados activamente en ensayos clínicos

Tabla 4: Antígenos asociados de tumor investigados activamente en ensayos clínicos

Antígeno	Neoplasia	Dianas “off-tumor” potenciales
BCMA	MM	Linfocitos B
CAIX	RCC, tumores sólidos en hipoxia	Mucosa gástrica Epitelio pancreaticobiliar Criptas del intestino delgado
CD123	AML	Progenitores mieloides Células dendríticas Linfocitos B Macrófagos Megacariocitos Mastocitos Monocitos Células endoteliales
CD138	MM	Epitelio Células plasmáticas y precursores B
CD19	LLA, LLC, LNH, LH, LLP	Linfocitos B normales
CD20	LLC, LNH	
CD22	LLA, LNH	
CD30	LNH, LTC, LH	Linfocitos T CD8 latentes Linfocitos Th2 y B activados
CD33	LMA	Progenitores hematopoyéticos Precursores mielomonocitos Monocitos
CD38	MM, LNH, LLC	PBMCs Cerebro y ojo Medula ósea Musculo Hueso Próstata Intestino Riñón Páncreas
CD44v6	Cáncer de cabeza, cuello, hígado, páncreas, mama, colon, estomago, LMA, LNH, MM	Queratinocitos de la piel Linfocitos T activados Monocitos
CD44v7/8	Cáncer cervical y de mama	Epitelios normales
CEA	Cáncer colorrectal, tumores sólidos y de mama	Superficie epitelial apical del colon Esófago Lengua Estomago
c-MET	TNBC	Hígado Tracto gastrointestinal Cerebro Riñones Cerebro

CS1	MM	Célula plasmática Natural killer, Linfocitos T CD8 Células dendríticas Monocitos activados
CSPG4	Melanoma, TNBC, GBM, mesotelioma, cancer de cabeza y cuello, osteosarcoma	Células basales de la epidermis Pericitos activados Células endoteliales
EGFR	Tumores solidos	Tejidos de origen mesenquimal, neuronal y epitelial
EGFRvIII	Cerebral/SNC, gliomas, GBM	Ninguno
EphA2	Glioma, cancer de mama, colon, ovarios, próstata y páncreas	Endotelio
ErbB2	Cancer cerebral/SNC, GBM, glioma, de cabeza y cuello, tumores sólidos	Epitelio gastrointestinal, reproductivo, respiratorio y tracto urinario Piel Mamas Células hematopoyéticas
FAP	Mesotelioma	Fibroblastos en inflamación crónica Tejido en remodelación
FR-α	Cancer de ovario	Superficie apical en epitelios de riñón Pulmón Tiroides Mamas
GD2	NB, sarcomas, tumores solidos	Piel Neuronas
IgK	LLC, LNH, MM	Linfocitos B normales
IL-11Rα	Cancer de colon, mama, estomago, próstata y osteosarcomas	Tejido estromal de tracto gastrointestinal Células endoteliales Hígado Epitelios glandulares y de superficie
L1-CAM	NB	Astrocitos Cerebro Tejido de cabeza y cuello
Lewis	LMA, MM	SNC Ganglios SN simpático Medula adrenal
Mesotelina	Mesotelioma, cancer de ovario y páncreas	Células progenitores mieloides tempranas
MUC1	Cáncer de pulmón, mama, colon, ovario, riñón, estomago, próstata, cabeza y cuello	Superficies pleurales, pericardial y mesotelial peritoneal
NKG2D-L	LMA, MM	Superficie apical de la mayoría de los epitelios glandulares
PSCA	Cancer de próstata, vejiga y páncreas	Epitelio gastrointestinal Fibroblastos Células endoteliales
PSMA	Cancer de próstata	Próstata
ROR-1	LLC, LNH	Superficie apical de epitelios de próstata e intestinal Células del túbulo proximal
VEGFR-2	Tumores sólidos	Endotelio vascular y linfático

Abreviaturas: LLA, leucemia linfoblástica aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; BCMA, antígeno de maduración de célula B; CAIX, anhidrasa carbónica IX; CEA, antígeno carcinoembrionario; LLC, leucemia linfocítica crónica; SNC, sistema nervioso central; CSPG4, proteoglicano condroitín sulfato 4; DC, célula dendrítica; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGFRvIII, variante III del EGFR; EphA2, carcinoma hepatocelular productor de eritropoyetina A2; FAP, proteína de activación de fibroblastos; FR- α , receptor de folato α ; GBM, glioblastoma multiforme; HL, linfoma de hodgkins; Ig, Inmunoglobulina; L1-CAM, molécula de adhesión celular L1; MM, mieloma múltiple; NB, neuroblastoma; NHL, linfoma no hodgkins; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; PLL, leucemia prolimfocítica; PSCA, antígeno de células madre de la próstata; RCC, carcinoma de célula renal; TCL, leucemia/linfoma de célula T; TNBC, cáncer de mama triple negativo; VEGFR-2, factor de crecimiento endotelial vascular-2. Tabla adaptada de: (38,91,92)

Anexo B: moléculas participes en la respuesta antitumoral y sus funciones

Tabla 5: moléculas participes en la respuesta antitumoral y sus funciones

Molécula	Función en la respuesta inmune antitumoral
IL-10	Inhibe la respuesta inmune y limita la inflamación excesiva.
IL-4	Promueve la respuesta inmune tipo Th2 y la producción de anticuerpos.
CTLA-4	Actúa como un freno para la respuesta inmune, regulando negativamente la activación de las células T.
IL-13	Puede tener efectos tanto promotores como inhibidores en el sistema inmune antitumoral. Puede activar y reclutar células del sistema inmune y mejorar la presentación de antígenos tumorales.
PD-L1	Actúa como un ligando inhibidor para el receptor PD-1 en las células T, regulando la respuesta inmune y previniendo respuestas excesivas.
IDO	Suprime la respuesta inmune al deplecionar el triptófano y generar metabolitos que inhiben la proliferación de células T.
FasL	Induce apoptosis (muerte celular programada) en células objetivo, contribuyendo a la eliminación de células dañadas o infectadas.
IL-2	Estimula la proliferación y diferenciación de células T, promoviendo su supervivencia y activación.
TNF-α	Es una citocina proinflamatoria que participa en la respuesta inmune antitumoral, promoviendo la inflamación y la destrucción de células tumorales.
IFNγ	Estimula la actividad citotóxica de las células T y NK contra células tumorales, así como la presentación de antígenos y la producción de moléculas inmunomoduladoras.
IL-1	Activa las respuestas inflamatorias y promueve la activación de células T y macrófagos.
IL-12	Estimula la producción de interferón gamma (IFN γ) por parte de células T y NK, aumentando la respuesta inmune antitumoral.
CCL5	Atracción y activación de células del sistema inmune, como células T y NK, para dirigir las hacia el sitio tumoral y promover una respuesta inmune antitumoral.