

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMAS DE ESTUDIO DE POSGRADO

UTILIDAD DE LAS CÉLULAS T CON RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO  
(CAR T) EN EL TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Trabajo final de investigación sometido a consideración de la Comisión del Programa en  
Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de Especialista en Hematología  
Clínica

MARÍA FERNANDA ULATE ULATE

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021



**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

**ACTA-64-2021**

**Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación**

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 28 de julio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **María Fernanda Ulate Ulate** carné #**B26745**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Hematología**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: **Melissa Granados Zamora, MSc.** quien preside y tutora, **Kathia Valverde Muñoz, Esp.** y **José Pablo Mora Fallas, Esp.**, lectores.

**ARTICULO 1**

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **"Utilidad de las células con receptor de antígeno quimérico (CAR T) en el tratamiento de las neoplasias hematológicas"**.

**ARTICULO 2**

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

**ARTICULO 3**

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado  Reprobado

**ARTICULO 4**

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 20:15 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
Melissa Granados Zamora, MSc. Quien preside		1-1206-0870
Kathia Valverde Muñoz, Esp.		107280522
José Pablo Mora Fallas, Esp.		110950991
María Fernanda Ulate Ulate Estudiante		115600025

Observaciones: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita  
**Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones**

## **Tabla de contenidos**

<b>Objetivo General</b> .....	1
Objetivos Específicos .....	1
<b>Antecedentes</b> .....	1
<b>Justificación</b> .....	2
<b>Metodología</b> .....	3
<b>Capítulo I. Descripción de las células CAR T como tratamiento para las neoplasias hematológicas</b> .....	4
<b>Capítulo II. Ventajas e inconvenientes asociadas al uso de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas</b> .....	16
<b>Capítulo III. Utilidad de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas mieloides</b> .....	30
<b>Capítulo IV. Utilidad de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas linfoides</b> .....	38
Leucemia linfocítica aguda (LLA).....	39
Mieloma múltiple .....	43
Linfomas .....	55
Células CAR NK .....	59
Leucemias con rearrreglo MLL (r-MLL) .....	60
<b>Conclusiones</b> .....	62
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	64

## **Objetivo General**

Analizar la utilidad de las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR T) en el tratamiento de las neoplasias hematológicas.

## **Objetivos Específicos**

1. Describir las células CAR T como tratamiento para las neoplasias hematológicas.
2. Identificar las ventajas e inconvenientes asociados al uso de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas.
3. Detallar la utilidad de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas mieloides.
4. Detallar la utilidad de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas linfoides.

## **Antecedentes**

El sistema inmune es el encargado de identificar agentes extraños en el organismo mediante el reconocimiento de proteínas antigénicas a través de los diferentes receptores celulares que se unen a esos antígenos y generan toda una cascada de señalización y respuesta celular para la destrucción o neutralización de ese agente extraño. Esta interacción antígeno-receptor es sumamente específica (Sánchez et al., 2018).

Las células malignas también tienen antígenos; sin embargo, si las células del sistema inmune no tienen receptores específicos, no pueden hacer la interacción necesaria para destruirlas. Además, es frecuente que estas células utilicen diferentes mecanismos para evadir el sistema inmune y seguir proliferando de manera descontrolada (Mirones et al., 2020).

Por lo anterior, la inmunoterapia es una alternativa que pretende aprovechar, manipular e incrementar la capacidad de defensa que tiene el organismo para atacar y eliminar las células malignas (Sánchez et al., 2018).

Las células T son un componente crítico del sistema inmune adaptativo, ya que no solo tienen efectos citotóxicos, sino que también proporcionan memoria celular de antígenos específicos a largo plazo. Por lo general, un paciente tendrá linfocitos infiltrantes específicos para su tumor, pero estas células a menudo son reeducadas por el microambiente tumoral para que se vuelvan anérgicas y no funcionales (Townsend et al., 2018).

En el 2017, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó dos terapias de células CAR T para su uso en diferentes tipos de neoplasias y en el 2018 la Sociedad Americana de Oncología nombró la terapia con células CAR T como el avance del año (*Células T con CAR*, 2013a).

En la actualidad, la inmunoterapia antitumoral constituye el principal sector en el desarrollo de ensayos clínicos a nivel global (*Células T con CAR*, 2013a).

## **Justificación**

Los tratamientos convencionales para las neoplasias hematológicas conllevan alto riesgo de mortalidad y morbilidad, debido a sus efectos celulares ablativos que exponen al paciente a una serie de complicaciones como infecciones o sangrados. La mayoría de estas terapias

siguen protocolos genéricos y poco específicos, orientados a las necesidades de cada tipo de patología, pero no de cada individuo.

Además de los efectos adversos, las recaídas son muy frecuentes en algunas neoplasias hematológicas, incluso en aquellas en las cuales se considera el trasplante de células madre como la terapia curativa. Por ejemplo, el mieloma múltiple posee porcentajes de recaída hasta del 80%.

Otro inconveniente es que algunos pacientes presentan alteraciones moleculares y citogenéticas que los hacen resistentes a algunos tratamientos, como es el caso de la resistencia a inhibidores de tirosina quinasa por la presencia de mutaciones en el gen ABL en las leucemias mieloides crónicas.

Por esta razón, los tratamientos contra las neoplasias hematológicas están en constante evaluación e investigación y frecuentemente se plantean nuevas estrategias para el abordaje de estas. Las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR T) son un ejemplo de ello, ya que plantean la posibilidad de utilizar la inmunoterapia celular con el fin de dar una opción más dirigida y personalizada a las células neoplásicas de cada paciente.

## **Metodología**

Se realizará una revisión bibliográfica exhaustiva y sistemática de artículos científicos relacionados con el tema en investigación, a través de consulta de diferentes bases de datos, entre ellos Pubmed, Science Direct, SciELO y Dialnet. El periodo de las publicaciones a

consultar será del año 2012 al 2021. Las palabras clave a utilizar serán inmunoterapia celular, receptor de antígeno quimérico y células CAR T.

Se utilizará como guía las publicaciones realizadas por el Dr. Carl June, quien es director del Centro de Inmunoterapia Celular de la Universidad de Pensilvania y pionero en esta terapia.

Además, se consultarán fuentes de información periodísticas, de hospitales y centros de investigación que están ofreciendo el tratamiento con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR T) en el tratamiento de las neoplasias hematológicas.

Se comparará las diferentes fuentes para poder analizar críticamente la información recopilada y excluir la que no sea pertinente para la investigación.

## **Capítulo I. Descripción de las células CAR T como tratamiento para las neoplasias hematológicas**

Desde el punto de vista fisiológico, los clones de células T específicos de malignidad están preparados para erradicar las células tumorales mediante estimulación previa a través de una célula presentadora de antígeno (APC), principalmente células dendríticas. La interfase linfocito T-APC es compleja e implica la interacción de receptores en cualquiera de las

células con sus ligandos afines en la otra. La evidencia experimental ha establecido que para una activación óptima de las células T, deben ocurrir al menos 2 tipos particulares de interacciones receptor-ligando, por lo que se planteó el concepto de un modelo de 2 señales de activación de las células T. La primera señal, comúnmente conocida como señal 1, se entrega a través de la interacción de un complejo de TCR clonal y su molécula accesoria, CD4 o CD8, con un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) específico de TCR en una APC. Esta interacción conduce al inicio de la señalización descendente a través del TCR. De forma aislada, la señal 1 es incapaz de activar una célula T y, cuando se administra sola, puede provocar muerte celular o un estado sin respuesta, llamado anergia (Daniyan & Brentjens, 2016).

Para que se realice la activación de las células T y la proliferación subsiguiente, las APC deben entregar una señal coestimuladora secundaria, la señal 2. Las dos familias de receptores principales involucradas en la mediación de la coestimulación en las células T son las siguientes: 1) la familia CD28, que incluye CD28 e ICOS, interactuando con sus ligandos afines CD80 / CD86 y B7 - H2, respectivamente, y 2) el TNFRSF, incluidos 4-1BB, CD27 y OX40, interactuando con 4-1BBL, CD70 (CD27L) y OX40L, respectivamente. Mientras que la interacción del TCR-MHC asegura la activación potencial de una célula T específica, la entrega de señales coestimuladoras puede tener consecuencias variables en el destino de las células T, incluida la supervivencia, la función efectora y el establecimiento de la memoria. En el caso de una célula T específica de un tumor, una vez que el TCR liga su péptido afín mostrado dentro de un MHC, la célula T inicia una cascada citolítica que da como resultado la muerte de la célula diana (Daniyan & Brentjens, 2016).

La inmunogenicidad de los antígenos específicos de tumores (TSA) depende de su capacidad para ser procesados por la maquinaria de presentación de antígenos de la célula tumoral, para que esta proteína procesada se muestre en un MHC y para que este complejo sea reconocido por un TCR apropiado. Sin embargo, existen proteínas extracelulares que se expresan tanto en células normales como tumorales y se les conoce como antígenos asociados a tumores (TAA) (Daniyan & Brentjens, 2016).

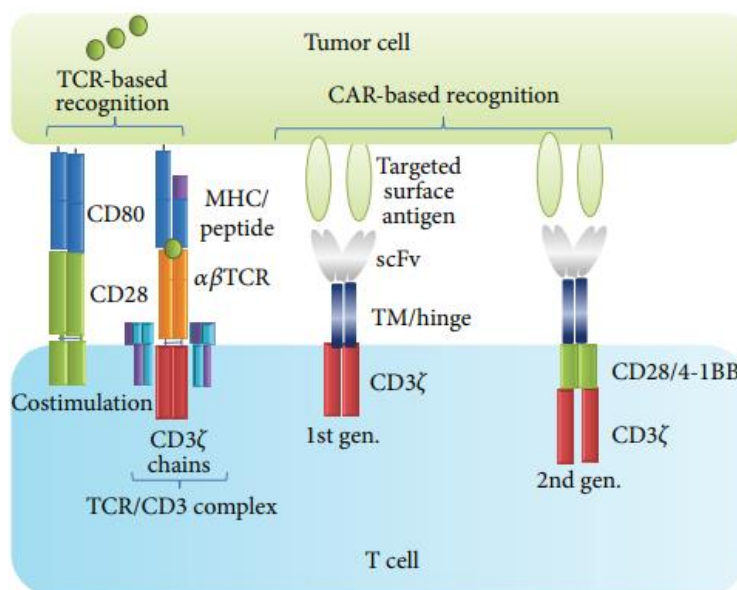
Los TAA de conformación nativa normalmente no son diana de las células T endógenas y, cuando se procesan, es menos probable que sean inmunogénicos debido a la auto-tolerancia,



por su presencia en células no transformadas. Sin embargo, estos TAA pueden reconocerse con inmunoglobulinas derivadas exógenamente, que tienen un dominio de reconocimiento de antígenos y, a diferencia del TCR, pueden reconocer antígenos no procesados expuestos a la superficie de una manera independiente del MHC (Daniyan & Brentjens, 2016).

El receptor de antígeno quimérico (CAR) es una proteína de fusión que contiene un dominio extracelular de unión a la diana, generalmente derivado del fragmento variable de cadena única (scFv) de anticuerpos, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que contiene CD3 $\zeta$  vinculado con moléculas coestimuladoras como CD28, CD137 y CD134 (Wang et al., 2017).

Las células T diseñadas para expresar CAR son capaces de reconocer específicamente su antígeno objetivo a través del dominio de unión scFv, lo que resulta en su activación en una forma independiente de un complejo de histocompatibilidad (MHC). (Wang et al., 2017) Contrario a lo que sucede con las células T endógenas, las cuales requieren de la interacción entre los péptidos mostrados por MHC y su TCR para activarse (Townsend et al., 2018).



**Figura 1.** Elementos implicados en el reconocimiento y activación de TCR y CAR. El TCR es un heterodímero enlazado por disulfuro que consta de una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$  expresadas con cadenas CD3 invariantes ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  y  $\epsilon$ ). El TCR reconoce proteínas intracelulares o extracelulares presentadas como péptidos por moléculas MHC. La coestimulación de CD28 a través de sus ligandos (CD80/ CD86), es necesaria para la activación y producción óptima de interleucina-2 (IL-2) y otras citocinas. Si bien la mayoría de los tumores hematológicos expresan moléculas coestimuladoras, las células tumorales sólidas, así como las células presentadoras de antígenos en el microambiente tumoral, generalmente carecen de tales moléculas. Los CAR reconocen los antígenos de superficie de forma independiente del MHC.

Los CAR son proteínas de fusión entre fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo monoclonal y uno o más dominios de señalización intracelular del receptor de células T. Se utilizan diversas bisagras y dominios transmembrana para unir las moléculas de reconocimiento y señalización. Mientras que los CAR de primera generación se señalizan a través de la cadena CD3 $\zeta$  únicamente, los CAR de segunda generación incluyen un dominio de señalización de una molécula coestimuladora, por ejemplo, CD28, 4-1BB, OX40, CD27 o ICOS (Figura 1) (Almåsbaek et al., 2016).

Al agregar señales coestimuladoras las células CAR serían capaces de entregar las señales 1 y 2 tras la unión con el antígeno diana y esto implica que se realice la activación de las células T y la proliferación subsiguiente (Daniyan & Brentjens, 2016).

El dominio extracelular de la construcción transgénica CAR reconoce un objetivo previamente definido en las células leucémicas o tumorales. Al unirse a este objetivo, la construcción quimérica que contiene dominios de señalización coestimuladores, activa a la célula CAR T, lo cual resulta en la muerte de la célula tumoral que porta el antígeno diana y estimula las células inmunes en el microambiente tumoral (Pérez-Rojo, s. f.).

Los CAR T de primera generación mostraron muerte y persistencia mínimas in vivo, probablemente debido a la activación y expansión de células T de bajo nivel en respuesta a los antígenos tumorales (Siddiqi et al., 2018).

La mayoría de las células CAR T de segunda generación incorporan dominios de señalización CD28 o 4-1BB y la experiencia clínica sugiere que las células que contienen CD28 experimentan una expansión más rápida y posteriormente disminuyen, mientras que los CAR 4-1BB confieren una persistencia más larga. 4-1BB se asocia con un fenotipo de memoria, que en teoría mejora la persistencia de las células CAR T, mientras que CD28 se asocia con un fenotipo de células T efectoras (Sidana & Shah, 2019).

Se ha visto que células CAR T de segunda generación basadas en 4-1BB experimentan una proliferación *in vitro* independiente del antígeno después de la estimulación inicial de las células T, lo que podría conducir a una expansión y persistencia *in vivo* aumentadas, lo que resulta en períodos libres de enfermedad más prolongados (Daniyan & Brentjens, 2016).

Los CAR T de tercera generación que incorporan CD28-4-1BB o CD28-OX40 en combinación han demostrado una activación sostenida de las células T (Almåsbaek et al., 2016).

Las inconsistencias en los resultados que comparan las células CAR T de segunda y tercera generación se complican aún más por las diferencias en los materiales y métodos utilizados por los diversos grupos de investigación, incluida la elección de los fragmentos scFv utilizados (es decir, de qué hibridomas se derivaron), la estructura arquitectónica del receptor (CD28 vs.4-1BB), y el método de entrega del constructo a las células o los vectores (Daniyan & Brentjens, 2016).

Por ejemplo, los vectores gamma retrovirales tienen una integración genómica eficiente con expresión génica estable, no son tan costosos, transducen sólo células en división y tienen riesgo de mutagénesis insercional. Mientras que los vectores lentivirales pueden transducir células que no están en división y el riesgo de mutagénesis insercional es menor. Por otro lado, los elementos transponibles como La Bella Durmiente y PiggyBac son menos inmunogénicos que los vectores retrovirales, el vector es entregado por electroporación y no es tan costoso (Daniyan & Brentjens, 2016).

En la electroporación lo que sucede es que se le dan choques eléctricos a los linfocitos para que las membranas permitan la entrada de los plásmidos que están en suspensión con las células. Sin embargo, lo que más se usa actualmente son los vectores lentivirales, debido a

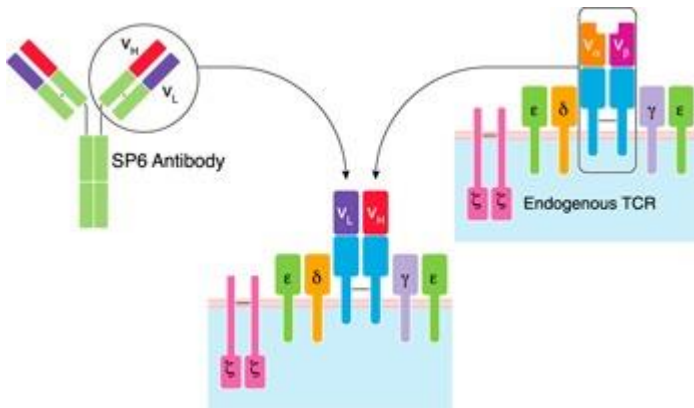
que son muy eficientes incorporando el genoma al ADN linfocitario (A. Montero, comunicación personal, 2021).

Las CAR T de cuarta generación, conocidos como células T redirigidos para la matanza iniciada por citoquinas (TRUCKs) codifican genes para la producción de citoquinas, lo cual aumenta la actividad de las CAR T. También pueden codificar genes suicidas para prevenir la toxicidad (*Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies / Journal of Hematology & Oncology / Full Text*, s. f.).

La eficacia de la terapia adoptiva con células T (ATC) en cánceres humanos se demostró por primera vez mediante la inducción de la remisión molecular después de la infusión de linfocitos del donante (DLI) en neoplasias mieloides que recaen después de un trasplante de médula ósea. La ATC que utiliza células T específicas del virus de Epstein Barr (EBV) mostró beneficio clínico en varias neoplasias malignas asociadas al EBV, incluyendo la enfermedad de Hodgkin, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo (Almåsbaek et al., 2016).

En 1989, Eshhar y sus colegas generaron por primera vez genes TCR quiméricos que pueden expresarse funcionalmente en células T. En 1993, para lograr las ventajas de la especificidad del anticuerpo y la actividad citotóxica de las células T, Eshhar combinó un dominio de región variable de cadena única (scFv) de una molécula de anticuerpo con el dominio de región constante del TCR, para construir un gen receptor quimérico y posteriormente inducir a las células T a expresar este gen mediante la generación de células T quiméricas, que luego se denominaron "CAR de primera generación" (Figura 2) (Pang et al., 2018).

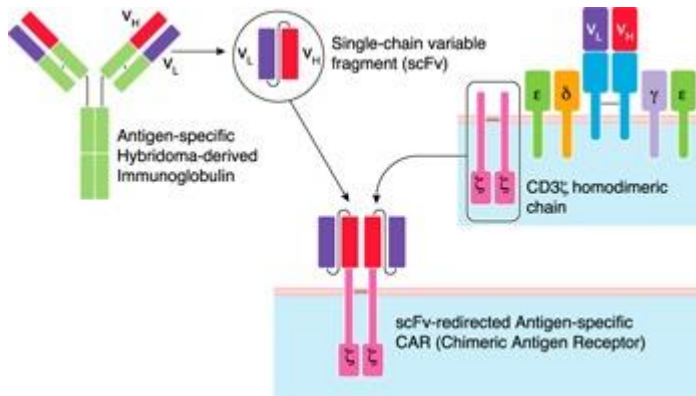
Eshhar et al. fueron los primeros en demostrar que vincular el scFv con el TCR para la transducción de señal, proporciona linfocitos T con especificidad de tipo anticuerpo y activa todas las funciones de una célula efectora, incluyendo la producción de IL-2 y la lisis de las células objetivo (D'Aloia et al., 2018).



**Figura 2.** Primer receptor de antígeno quimérico basado en células T (Daniyan & Brentjens, 2016).

En 1993, se mejoró el diseño del CAR mediante la integración de los fragmentos de orientación y señalización en una sola cadena polipeptídica (Figura 3). Las cadenas VL y VH de MOv18, un anticuerpo contra el carcinoma de ovario dirigido al receptor de folato  $\alpha$ , se combinaron mediante un enlazador flexible que forma un scFv. Este scFv se fusionó luego en línea con la cadena FcR $\gamma$ , una molécula transmembrana homodimérica con una estructura y de señalización similares a CD3  $\zeta$ . Con el uso de la tecnología contemporánea de transferencia de genes que permitió la integración de material genético en las células T primarias mediante la transducción basada en gammaretrovirales, esta construcción se introdujo con éxito en las células T humanas obtenidas a partir de linfocitos derivados del melanoma (Daniyan & Brentjens, 2016).

Actualmente las células CAR T que más se están utilizando a nivel clínico son los CAR T de segunda generación (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

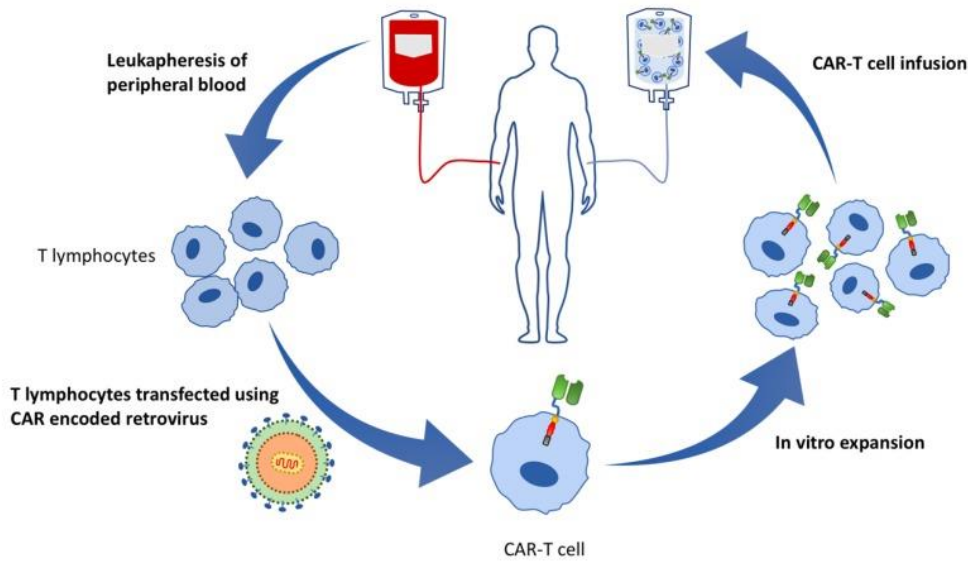


**Figura 3.** CAR T de primera generación. (Daniyan & Brentjens, 2016)

En 1990, se comenzaron a realizar los primeros estudios preclínicos de las células CAR T para el tratamiento del cáncer de ovario. En 2003, se publicaron las primeras investigaciones que demostraron la actividad, tanto in vitro como in vivo, de las células CAR T dirigidas al antígeno CD19 (Sánchez et al., 2018).

Estas terapias se basan en los repertorios endógenos de las células T, pero los recientes avances tecnológicos en la ingeniería de células T con vectores retrovirales y plásmidos permiten la generación de células T dirigidas mediante la introducción genética de receptores de células T (TCR) o CARs específicos de tumores (Almåsbaek et al., 2016).

En cuanto al procedimiento de producción e infusión de las células CAR T, se inicia con la recolección de sangre periférica del paciente o de un donante, de la cual se separan las células T mediante leuco aféresis. Las células T se pueden aislar en presencia de perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos CD3 o CD28. Los linfocitos T son transfectados por un vector viral o no viral, el cual lleva los genes que codifican la secuencia CAR para modificar las células T. Las células CAR-T se expanden ex vivo por un periodo de 10 a 14 días para alcanzar un recuento terapéutico relevante. Luego se remueven las perlas magnéticas y se prepara la formulación, ya sea para congelación o transferencia al paciente. El paciente debe someterse a quimioterapia condicional antes de la infusión de las células CAR T (Britten et al., 2019). Este pre-acondicionamiento crea espacio para la expansión de las células infundidas, limita la competencia por las citoquinas IL-7 e IL-15, agota las células T reguladoras y activa el sistema inmunitario innato. (Figura 4) (Almåsbaek et al., 2016).



**Figura 4.** Ciclo del procedimiento de producción e infusión de células CAR-T. (Almåsbaek et al., 2016)

Luego de diseñar el CAR, los elementos CAR se clonan en un vector de estructura lentiviral o retroviral usando técnicas de clonación molecular estándar. Los vectores y los elementos CAR se transfectan en una línea celular de empaquetamiento que puede generar grandes títulos de virus portadores de CAR. Las células mononucleares de sangre periférica derivadas del paciente mediante leuco aféresis se estimulan luego con perlas anti-CD3 / CD28 para activar y expandir las células T. Durante la activación de CD3 / CD28, las células T del paciente se transducen con el CAR que lleva retro o lentivirus para producir células CAR T que contienen un CAR integrado y expresado de manera estable. Después de una expansión continua ex vivo, las células CAR T altamente enriquecidas se someten a lavado, concentración y crio preservación para su futura transferencia al paciente (Siddiqi et al., 2018).

El método general para la construcción de vectores virales consiste en sustituir los elementos patógenos por el material génico que se desea transferir. De este modo se consiguen partículas virales no replicativas pero infectivas con capacidad de transferir el material génico

terapéutico introducido en su genoma. Los vectores virales se fabrican en células empaquetadoras en el laboratorio. A estas células se les proporciona toda la información para la formación de la partícula viral, pero el virus resultante es incapaz de replicarse en la célula diana; en este caso, los linfocitos T (Enrique, s. f.).

La terapia génica CAR-T utiliza vectores virales derivados de lentivirus, que es un retrovirus. La característica principal de los retrovirus es que se integran en el genoma de la célula huésped, lo cual es necesario para transformar células dianas que necesitan dividirse. Por lo tanto, la progenie conservará el gen terapéutico. En la célula diana la infección de los retrovirus es iniciada por la unión de las proteínas virales de superficie a proteínas receptoras específicas de la superficie celular (Enrique, s. f.).

El virus modificado comparte con el virus salvaje las primeras fases. La primera fase es la de unión o adsorción, luego se da la entrada del virus por fusión de la membrana lipoproteica del virus y de la membrana de la célula huésped. Una vez dentro, la cápside proteica se rompe gracias a proteasas y quedan libres en el citoplasma el ARN viral y la transcriptasa inversa. Se realiza la transcripción inversa y el ADN pro viral penetra en el núcleo y se integra en el ADN del cromosoma de la célula hospedadora gracias a la integrasa. Hasta aquí el proceso lo comparte con el virus salvaje. El virus modificado genéticamente no contiene la información del ARN viral, de esta manera, no tiene capacidad de replicación. Los virus modificados por terapia génica derivados de lentivirus tiene una alta eficacia para infectar a los linfocitos T, pero llevando solo la información genética terapéutica, la que codifica para el receptor CAR (Enrique, s. f.).

Una alternativa a los sistemas virales son los transposones Piggy Bac (PB) y La Bella Durmiente (SB), los cuales permiten la integración de grandes secuencias de ADN en el genoma del huésped mediante un mecanismo de transposasa de "cortar y pegar". El uso de transposones en la terapia génica sería ventajoso por varias razones: simplicidad de la transducción genética, ya que se puede introducir en las células T por nucleofección; seguridad tanto para los pacientes como para los operadores, menos complejidad, menor costo y menos requisitos. PB y SB permiten un excelente estándar de expresión génica e integración en ausencia de proteínas extrañas que puedan provocar reacciones adversas.



Además, dado que los mecanismos de transposición no implican transcripción inversa, los vectores transposón no son propensos a incorporar mutaciones (D'Aloia et al., 2018).

Otra posibilidad es guiar la inserción de genes trans en sitios genómicos específicos sin afectar la estructura genética endógena. Las regiones génicas adicionales del genoma llamadas "puertos seguros" (GSH) podrían ser capaces de acomodar la expresión del ADN recién integrado sin generar efectos adversos en la célula huésped. Se han propuesto tres sitios intragénicos como puertos seguros (AAVS1, CCR5 y ROSA26) (D'Aloia et al., 2018).

Más recientemente, se han desarrollado métodos para aislar subconjuntos de células T definidos con el objetivo de controlar mejor el fenotipo de las células T transferidas (Almåsbaek et al., 2016).

Investigaciones anteriores han demostrado que las células T CD4 + y CD8 + humanas comprenden subconjuntos funcional y transcripcionalmente distintos que difieren en sus capacidades para proliferar y persistir in vivo después de la expansión in vitro y la transferencia adoptiva. Utilizando un modelo preclínico, se demostró que las células CAR T CD19 que se fabricaron a partir de células T de memoria central (TCM) CD8+ o CD4+ o células T vírgenes (TN) son más potentes en la eliminación de tumores CD19+ en ratones en comparación con células CD19 CAR-T que se fabricaron a partir de células T de memoria efectora (células TEM) (Turtle et al., 2016).

La infusión de productos de células CAR T que comprenden una proporción uniforme de células CD4+: CD8+ demostró una correlación entre la dosis celular y la expansión máxima más temprana y alta de células CAR T clonalmente diversas, un hallazgo que no se ha informado en estudios de células CAR T en las cuales se fabricaron e infundieron sin tener en cuenta esa proporción (Turtle et al., 2016).

Se ha demostrado que la quimioterapia condicional o la radiación con linfo-depletina previo a la infusión celular aumenta la eficacia de las células CAR T transferidas en ratones, y los resultados clínicos sugieren fuertemente que la quimioterapia que agota los linfocitos mejora la actividad de las células CAR T en humanos. Estos regímenes incluyen dosis variables de ciclofosfamida sola, fludarabina y ciclofosfamida, pentostatina y ciclofosfamida, regímenes

basados en bendamustina, así como varios regímenes específicos de enfermedad determinados por criterio del médico (Brudno & Kochenderfer, 2019).

Ningún régimen ha demostrado claramente que sea superior en términos de eficacia para optimizar la actividad de las células CAR T, o claramente más tóxico que otro. La adición de fludarabina a un régimen de ciclofosfamida sola puede aumentar los niveles sanguíneos máximos y la persistencia de las células CAR T, las tasas de respuesta, las tasas de toxicidad para el producto celular dado; aunque estos efectos no se han observado en todos los estudios en los que se han utilizado ambos regímenes (Brudno & Kochenderfer, 2019).

Para el tratamiento de tumores sólidos, se ha propuesto elaborar células CAR T que expresen catalasa para proteger a las células T de la represión oxidativa y heparinasa para mejorar la penetración de células T a través del estroma y mejorar la infiltración. Incluso células que expresen anticuerpos contra reguladores negativos del microambiente tumoral para evitar los efectos inhibitorios (Almåsbaek et al., 2016).

Estudios recientes han demostrado la viabilidad de estrategias de dominios de reconocimiento de antígenos alternativos. Por ejemplo, el diseño de células T CAR con desmogleína 3 (Dsg3) para atacar células B que causan pénfigo vulgar (enfermedad cutánea autoinmune), las cuales expresan el receptor de células B anti-Dsg3 (Siddiqi et al., 2018).

Los criterios que se toman en cuenta para definir cuales pacientes son candidatos a recibir terapia con células CAR T son variables. En primer lugar, no es un tratamiento de primera línea por lo que debe ser un paciente que se encuentre en segunda recaída. Esto tiene la desventaja de que los pacientes que llegan a segunda recaída normalmente tienen un sistema inmune deteriorado, lo cual dificulta la obtención de células T autólogas (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

Además, se debe evaluar en cada paciente la cantidad aproximada de linfocitos que se podrían editar genéticamente, así como su perfil inmuno fenotípico mediante citometría de flujo. Es importante evaluar dos tipos de marcadores, los de activación y los de agotamiento. Si un paciente tiene muchos marcadores de agotamiento, no es un buen candidato. Sin embargo, se deben tomar en cuenta otros criterios, principalmente clínicos para decidir otorgar esta terapia. Algunos marcadores de agotamiento son PD-1, LAG-3, CTLA4, TIGIT y TIM3. El

perfil de activación incluye los marcadores CD69, ICOS, HLA-DR y CD137. Estos marcadores ayudan a predecir el éxito de la terapia y a tomar decisiones en cuanto a modificaciones terapéuticas. Por ejemplo, si un paciente tiene alta expresión del marcador PD-1, se podrían suministrar las CAR T junto con un anticuerpo monoclonal contra PD-1 como pembrolizumab (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

No hay límite de edad para el uso de esta terapia, sino que va a depender de la población en la que ha sido validado cada CAR T (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

## **Capítulo II. Ventajas e inconvenientes asociadas al uso de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas**

Los principales efectos adversos que se presentan están relacionados con la dosis administrada y con la persistencia, es decir, la supervivencia de las células CAR T en la circulación del paciente (Sánchez et al., 2018).

La persistencia celular CAR-T depende de múltiples factores, incluidas las moléculas de señalización coestimulante seleccionadas. A menudo se observan incoherencias entre casos; un estudio informó que la duración promedio en sangre de las células CAR-T específicas de CD19 fue de 168 días en los 60 pacientes analizados. Por el contrario, otro estudio mostró que los niveles de células CAR-T eran bajos a indetectables después de 2-3 meses. A pesar de las diferencias en la persistencia, un estudio de seguimiento a largo plazo no encontró ninguna asociación entre la persistencia celular CAR-T y la longevidad de la remisión (Britten et al., 2019).

También son factores importantes la composición de las células CAR T, el tipo de células tumorales y su microambiente, así como el régimen de acondicionamiento en el receptor (Almásbak et al., 2016).

Para mejorar la persistencia de las células CAR T se recomienda el uso de vectores virales sobre la electroporación y podría añadirse al plásmido del CAR T, un gen para IL-15 que también favorece la persistencia celular o por el contrario, algún gen de inactivación (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021)

## Reconocimiento no específico de células tumorales

Uno de los principales problemas es la reacción de las células CAR T contra las células no tumorales. Lo ideal en este caso es encontrar antígenos que se expresen únicamente en las células tumorales y no en las normales, pero esto solo ha sido posible en el caso del antígeno EGFRvIII, que se expresa principalmente en células tumorales del glioblastoma (Wang et al., 2017).

El primer evento adverso mortal debido al reconocimiento fuera del tumor por parte de células CAR T ocurrió en un paciente con cáncer colorrectal tratado con un alto número de células CAR T de tercera generación dirigidas a ERBB2/HER2. El paciente desarrolló dificultad respiratoria y paros cardíacos poco después de la transferencia celular y murió de insuficiencia orgánica multisistémica 5 días después (Almåsbaek et al., 2016).

Una estrategia que se ha planteado es células CAR T con scFv de baja afinidad que aumenten la especificidad por las células tumorales que expresan el antígeno blanco en mayor cantidad que las células normales o el uso de células CAR T que se activan solo en presencia de ciertas moléculas interruptoras de por medio, como la rapamicina (Almåsbaek et al., 2016).

Otro esfuerzo por aumentar la especificidad y reducir la toxicidad, ha sido desarrollar receptores de antígenos quiméricos inhibidores (iCAR) para garantizar que las células T CAR no se dirijan al tejido sano. Las células iCAR están diseñadas con una señal de anulación incorporada. Cuando están en contacto solo con el antígeno tumoral, las células CAR T provocan una respuesta citotóxica a la célula diana, pero cuando están en contacto con antígenos tisulares normales, las células T se apagan eficazmente mediante la coestimulación antiinflamatoria (Townsend et al., 2018).

Esta nueva técnica puede proporcionar una forma de que los biomarcadores se utilicen en combinación para provocar efectos extremadamente específicos dentro del tumor y evitar la toxicidad de los tejidos sanos (Townsend et al., 2018).

En linfocitos T humanos, PD-1 y CTLA-4 son receptores inhibidores que controlan reversiblemente la reducción de la potencia de señalización TCR y se pueden utilizar para mitigar la activación de receptores quiméricos. Los dominios intracelulares CTLA-4 o PD-1

en iCARs desencadenan señales inhibitorias en linfocitos T, lo que conduce a una menor producción de citoquinas, lisis celular menos eficiente y motilidad de linfocitos alterada. La selección de antígenos es crítica para la eficacia de la terapia con células T iCAR, ya que la actividad antitumoral depende de la distribución de tejidos y la estequiometría entre antígenos normales y tumorales en las células objetivo (D'Aloia et al., 2018).

#### Recaída por pérdida de antígenos en las células tumorales

Otro inconveniente es la recaída que se presenta por pérdida de antígenos en las células tumorales. Se ha visto principalmente en los ensayos clínicos que implican CD19 en neoplasias malignas hematológicas. Parece ser más común en LLA-B y se ha observado en aproximadamente el 14% de los pacientes. También se ha documentado en LLC y linfoma primario de células B grandes mediastinales (Wang et al., 2017).

Se cree que esto sucede por un efecto de presión selectiva por exposición al tratamiento, donde se puede favorecer la proliferación de células tumorales preexistentes que no contaban con el antígeno blanco, así como la proliferación de células que lo pierden por la presión selectiva. Algunos de los mecanismos por los cuales se pueden perder estos epítomos son por deleciones o splicing alternativo. Además, algunos de estos antígenos pueden ser endocitados por la célula tumoral y expresarse únicamente a nivel citoplasmático (Wang et al., 2017).

#### Cambio de linaje leucémico

Otro mecanismo de escape puede ser el cambio de linaje leucémico. Se ha observado que las recaídas tempranas se asocian más con pérdida de expresión de antígenos blanco, mientras que las recaídas tardías se asocian con pérdida de múltiples marcadores y con cambio de linaje. Por esta razón es que se propone la elaboración de células CAR T dirigidas contra más de un antígeno. Por ejemplo, en el caso de la LLA-B, contra CD19 y CD123 o contra otros antígenos pan-B como CD22 o CD20. En el caso de la LMA se podrían usar contra CD123/CD33. Hay dos maneras de hacerlo, modificar las células T individuales con dos moléculas CAR distintas con dos dominios de unión diferentes (CAR de señalización dual)

o con una molécula de CAR que contiene dos dominios de unión diferentes en tándem (TanCAR) (Wang et al., 2017).

Además, esta estrategia es potencialmente adecuada para controlar la toxicidad fuera del tumor, ya que el reconocimiento combinado de antígenos mejora la erradicación selectiva del tumor y protege los tejidos normales que expresan un solo antígeno (D'Aloia et al., 2018).

Otra estrategia podría ser la infusión de dos poblaciones de células CAR T dirigidas contra dos antígenos diferentes, pero se ha visto que esto no es tan viable, debido a que cuando se encuentran ambas poblaciones en co-cultivo, hay tendencia a la proliferación aumentada de una población sobre otra (Wang et al., 2017).

### Inhibición de las células CAR T

Otro de los inconvenientes que se podría presentar es la secreción de factores solubles por parte de las células tumorales, que inhiben la proliferación de las células T. (Mardiana & Gill, 2020)

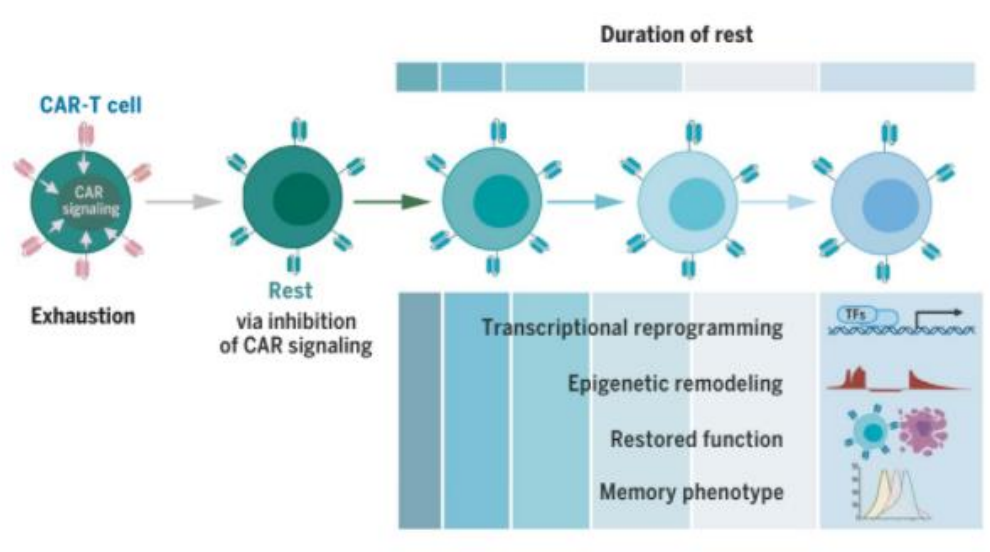
### Agotamiento de las células CAR T

El agotamiento de las células T limita las respuestas inmunes contra las células tumorales y es una de las principales causas de resistencia a la terapia con células CAR T. Utilizando modelos murinos se demostró que la señalización CAR constitutiva induce características de agotamiento. La inducción del descanso de la proteína CAR, utilizando un sistema regulable de fármacos o tratamiento con el inhibidor dasatinib, da lugar a la adquisición de un fenotipo de memoria similar a los efectos observados después del aclaramiento de antígenos en infecciones agudas, reprogramación transcripcional y epigenética global, lo cual reestablece la funcionalidad antitumoral en células CAR-T agotadas. De esta forma se demuestra que el descanso puede mejorar la eficacia de las células CAR-T al prevenir o revertir el agotamiento y desafía la noción de que el agotamiento es un estado epigenéticamente fijo (Weber et al, 2021).

El grado de revitalización funcional se correlacionó con la duración del descanso y se asoció con una disminución de la expresión del factor de transcripción asociado al agotamiento TOX

y el aumento de la expresión de los factores de transcripción asociados a la memoria LEF1 y TCF1 (Weber et al, 2021).

Estos resultados predicen que los regímenes de células CAR-T regulables que están diseñados para incorporar períodos de descanso pueden presentar una eficacia superior en comparación con las plataformas constitutivas, y plantean la estrategia de dirigirse a las quinasas proximales de señalización CAR o TCR para mitigar el agotamiento de las células T (Weber et al, 2021).



**Figura 5.** Esquema de inhibición transitoria o reposo de la señalización CAR (Weber et al, 2021)

El agotamiento en las células CAR-T se promueve y mantiene mediante la señalización excesiva CAR. La inhibición transitoria de la señalización CAR, o reposo, revierte los hallmarks de identidad fenotípicas y transcripcionales del agotamiento, remodela el epigenoma asociado al agotamiento y restaura la funcionalidad antitumoral. La duración del descanso se correlaciona con el grado en que se restaura la funcionalidad (Figura 5) (Weber et al, 2021).

Efectos adversos- Síndrome de liberación de citoquinas (CRS): Es el efecto no deseado más frecuente de todos. Se produce debido a una rápida y fuerte activación de las células T, lo cual aumenta su proliferación celular y la producción de diferentes citoquinas como interferón  $\gamma$ , IL- 2, IL- 6 e IL- 10. La IL-6 es muy importante en diferentes reacciones inflamatorias, se ha demostrado un pico en la concentración de esta citoquina cuando las células CAR T están en máxima proliferación, lo cual hace que se inicie toda la cascada de señalización inflamatoria. Además, esta interleuquina favorece la formación de proteína C reactiva en el hígado, por lo que se usa para monitorear a los pacientes (Sánchez et al., 2018).

Este síndrome se presenta días después del inicio del tratamiento y es muy similar a un cuadro de sepsis; sus síntomas incluyen taquicardia, hipotensión, fatiga, náuseas, disnea e hipoxia (Sánchez et al., 2018).

Los pacientes pueden desarrollar disnea e hipoxia debido al edema pulmonar en el contexto de un síndrome de extravasación capilar causado por citocinas circulantes. En casos graves, los pacientes pueden requerir ventilación mecánica debido a insuficiencia respiratoria (Brudno & Kochenderfer, 2019).

En cuanto a las alteraciones cardíacas, además de la taquicardia sinusal, se han informado otras arritmias, prolongación del intervalo QT, troponinemia y disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. Se han reportado aumentos transitorios de las enzimas hepáticas y la bilirrubina. De manera similar, puede ocurrir insuficiencia renal por un aumento transitorio de la creatinina sérica. En casos graves, los pacientes han requerido apoyo temporal para hemodiálisis. Pueden ocurrir diversos trastornos electrolíticos, como hiponatremia, hipopotasemia e hipofosfatemia (Brudno & Kochenderfer, 2019).

Los pacientes con alto riesgo de CRS grave incluyen aquellos con enfermedad grave, comorbilidades y aquellos que desarrollan CRS de inicio temprano dentro de los 3 días posteriores a la infusión celular; sin embargo, la correlación entre el desarrollo de CRS grave y los parámetros clínicos es imperfecta y se necesita la identificación de biomarcadores predictivos de toxicidad grave. Los hallazgos han demostrado que los niveles séricos altos de IL-6, gp130 soluble, IFN  $\gamma$ , IL-15, IL-8 y / o IL-10 antes o 1 día después de la infusión de células T CAR están asociados con el desarrollo posterior de CRS1 grave, pero estos resultados necesitan ser confirmados en estudios prospectivos. De hecho, los valores



predictivos de estos biomarcadores parecen variar según el tipo de producto de células CAR-T utilizado (Neelapu et al., 2018).

El riesgo de este efecto adverso podría verse incrementado con el uso de células CAR T de señalización dual o TanCAR. Además, tiende a ocurrir antes en pacientes tratados con CAR anti-CD19 – CD28 – CD3 $\zeta$  que en aquellos tratados con CAR anti-CD19–4–1BB – CD3 $\zeta$  (Wang et al., 2017).

CRS suele acompañarse con el síndrome de activación macrofágica (SAM). En ese caso, ambos pueden ser tratados con el anticuerpo monoclonal tocilizumab que bloquea la acción de la IL-6 y reduce la inflamación (Almåsbaek et al., 2016).

El uso del tocilizumab fue aprobado por la FDA en el 2017. Hasta la fecha, el tocilizumab se ha utilizado con más frecuencia que el siltuximab para el tratamiento de CRS, y el uso de este agente no parece afectar la eficacia de la terapia con células CAR-T, en términos de tasas de respuesta general, tasas de respuesta completa o durabilidad de respuestas (Neelapu et al., 2018).

Sin embargo, no está claro si el uso de tocilizumab ofrece ventajas sobre el siltuximab. El primero se une al receptor de la IL-6 y podría competir por su afinidad con la IL-6 de manera no tan eficiente, mientras que el siltuximab se une directamente a la IL-6, inhibiendo su unión con el receptor. Además, se ha demostrado que los niveles de IL-6 en suero aumentan después de la administración con tocilizumab al prevenir la captación del IL-6 en los tejidos periféricos, lo cual podría incrementar la difusión pasiva de IL-6 al sistema nervioso central y aumentar el riesgo de neurotoxicidad. Esto es poco probable con siltuximab, pues se une directamente a la IL-6 (Neelapu et al., 2018).

La hiperferritinemia severa (> 20.000 ng/ml) no se observa típicamente en infecciones, incluso en pacientes sometidos a grandes transfusiones, por lo que podría servir como una herramienta útil para distinguir el síndrome de liberación de citoquinas de otras causas de fiebre después de la infusión de células CAR-T (Turtle et al., 2016).

Mientras que los pacientes generalmente responden a terapias anti-IL 6 y tratamiento con corticosteroides, el SAM fulminante y refractario se observa en ~ 1% de los pacientes

tratados con terapia con células CAR-T, y necesita terapia adicional. De hecho, se asocia con una alta mortalidad si no se trata con prontitud; sin embargo, el diagnóstico de SAM puede ser difícil en el contexto de CRS. Muchos de los criterios diagnósticos tradicionales para SAM como fiebre, esplenomegalia, citopenias en al menos dos de tres linajes de células hematopoyéticas, hiper trigliceridemia o hipofibrinogenemia con dímeros D elevados, hemofagocitosis en médula ósea, hiperferritinemia, niveles altos de CD25 soluble y actividad de células NK baja o ausente, no son específicos y se pueden observar con frecuencia en pacientes con CRS incluso de bajo grado y también en aquellos con neoplasias hematológicas en estadio avanzado en ausencia de terapia con células CAR-T. Por lo tanto, se necesitan nuevos criterios para el diagnóstico de SAM en pacientes con CRS después de la terapia con células CAR-T (Neelapu et al., 2018).

En términos generales, el objetivo de la terapia para SAM es suprimir las células CD8+ hiperactivas y los macrófagos que dirigen este síndrome inmunológico; sin embargo, los tratamientos actuales no atacan específicamente a estos tipos de células. En un futuro próximo, las citocinas específicas que desempeñan un papel central en SAM, como el IFN $\gamma$ , probablemente podrán ser un blanco terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti IFN $\gamma$  humanizado, NI-0501, produjo respuestas en 9 de 13 niños con SAM primaria refractaria, con buena tolerabilidad (Neelapu et al., 2018).

- **Aplasia de células B:** Sucede en células CAR T dirigidas contra el CD19. Esta depleción de células B puede llevar a hipogammaglobulinemia, lo cual aumenta la probabilidad de adquirir infecciones (Sánchez et al., 2018).

Para mitigar esta toxicidad, los pacientes reciben reemplazo mensual de inmunoglobulina; sin embargo, se necesita un seguimiento a largo plazo para evaluar los efectos tardíos de la aplasia de células B (Almåsbak et al., 2016).

Por otro lado, los pacientes que reciben infusiones de células CAR T pueden estar significativamente inmunosuprimidos debido a la quimioterapia de acondicionamiento y su malignidad subyacente. Por lo tanto, son susceptibles a infecciones virales, bacterianas y fúngicas invasivas (Brudno & Kochenderfer, 2019).

- **Síndrome de lisis tumoral y anafilaxia:** Hay un aumento en la lisis de células tumorales, por lo que se liberan metabolitos que pueden ocasionar diferentes alteraciones como insuficiencia renal aguda e incluso la muerte. Estos pacientes requieren soporte hemodinámico con líquidos endovenosos (Sánchez et al., 2018).

Además, puede haber casos de anafilaxia en CAR T que tengan anticuerpos derivados de murinos (Sánchez et al., 2018).

- **Neurotoxicidad:** El tratamiento con CAR T puede producir confusión, delirio, afasia, convulsiones y coma (Sánchez et al., 2018). La manifestación de neurotoxicidad puede ser bifásica; la primera fase ocurre simultáneamente con fiebre alta y otros síntomas de CRS, típicamente dentro de los primeros 5 días después de la inmunoterapia celular, y la segunda fase ocurre después de que la fiebre y otros síntomas de CRS desaparecen, a menudo más allá de los 5 días después de la infusión de células. En particular, la neurotoxicidad retardada con convulsiones o episodios de confusión se producen durante la tercera o cuarta semana después de la terapia con células CAR-T en aproximadamente el 10% de los pacientes. También se ha observado que la terapia anti-IL-6 puede revertir la neurotoxicidad durante la primera fase, pero generalmente no es efectiva en la segunda fase, en este caso, se utilizan los corticosteroides (Neelapu et al., 2018).

El mecanismo fisiopatológico de la neurotoxicidad aún no se ha determinado. Se pueden postular dos posibles explicaciones. En primer lugar, la difusión pasiva de citocinas en el cerebro, respaldada por el hallazgo de que los niveles séricos elevados de IL-6 e IL-15 se asocian con neurotoxicidad grave en pacientes tratados con terapia con células CAR-T. En segundo lugar, el tráfico de células T al sistema nervioso central (SNC), como lo indica la detección de células CAR T en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con neurotoxicidad, en ausencia de enfermedad maligna del SNC. La disfunción de otros órganos como el hígado y los riñones, así como la hipoxemia y la infección, también pueden contribuir a la encefalopatía (Neelapu et al., 2018).

El beneficio diferencial de la terapia anti-IL-6 entre las dos fases podría reflejar una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica durante la CRS que, en la fase posterior a la CRS, lo que permite una mayor difusión de la terapia en el cerebro. La neurotoxicidad suele

durar de 2 a 4 días, pero su duración puede variar desde unas pocas horas hasta semanas. En general, cuando ocurre al mismo tiempo que la CRS tiende a ser de menor duración y de menor grado (grado 1-2) que cuando ocurre después de la CRS, que es más comúnmente de grado  $\geq 3$  y prolongada. Además, la gravedad puede fluctuar rápidamente, por lo que se necesita una estrecha monitorización del paciente. Sin embargo, generalmente es reversible; aunque se han producido casos raros de muerte (Neelapu et al., 2018).

Se recomienda la profilaxis de las convulsiones con levetiracetam por vía oral o intravenosa cada 12 h durante 30 días, comenzando el día de la infusión para los pacientes sometidos a terapias con células CAR T que se han asociado a neurotoxicidad (Neelapu et al., 2018).

Debido a que se ha planteado la hipótesis de que las toxicidades como el síndrome de liberación de citoquinas y la neurotoxicidad de las terapias con células T CAR se producen como resultado del reconocimiento del antígeno por el receptor CAR, el cual es de naturaleza sintética; se ha diseñado un receptor alternativo, llamado acoplador de antígenos de células T, que reconoce antígenos independientes del MHC, pero se acopla al TCR nativo. La toxicidad en modelos preclínicos ha sido menor que la observada con las células T CAR, lo que se ha atribuido a que la respuesta de las células T está mediada por el TCR nativo (Sidana & Shah, 2019).

También se ha sugerido la posibilidad de que algunas drogas del pre-acondicionamiento sean las responsables de la neurotoxicidad, la fludarabina principalmente. Sin embargo, los síntomas neurológicos asociados con la fludarabina como agente quimioterapéutico son distintos de la neurotoxicidad de CD19 CAR-T. Específicamente, la neurotoxicidad asociada a fludarabina tiene un inicio tardío y no se reporta edema cerebral (Lowe et al., 2018).

- **Transferencia de genes:** La integración de los vectores utilizados para facilitar la transferencia de genes CAR a las células T podría constituir un riesgo de seguridad, ya que plantea la posibilidad de mutagénesis insercional, como se ha demostrado en los estudios de terapia génica de células madre en inmunodeficiencias primarias (Almåsbaek et al., 2016).

A pesar de que numerosos estudios con más de 500 pacientes a los que se les ha dado seguimiento por más de un año, han demostrado la seguridad de la transferencia de genes retrovirales a células T maduras, es demasiado pronto para concluir que la integración es

segura en una población de pacientes más grande y se necesitan estrategias eficaces para eliminar las células T modificadas (Almåsbaek et al., 2016).

Además de mutagénesis insercional, los vectores pueden activar genes cercanos al sitio de inserción debido a potenciadores en los vectores. La mutagénesis insercional a partir de vectores gamma retrovirales ha provocado leucemia en algunos estudios clínicos que utilizan células madre (Bryan, 2017).

Los vectores virales deben ofrecer seguridad desde el punto de vista microbiológico, es decir, que el producto biológico no esté contaminado. Para esto se necesita cumplir con las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y disponer de salas blancas especiales para trabajar con terapias celulares. El otro aspecto es la seguridad de inserción, para lo cual se pueden utilizar diferentes estrategias como por ejemplo evaluar *in silico* por medio de métodos bioinformáticos la inserción de diferentes vectores virales. De esta forma se puede predecir la posibilidad de inserción inespecífica. Luego de conocer los posibles sitios de inserción inespecífica, se hace un estudio de expresión. La mayoría de los estudios de expresión lo que hacen es una secuenciación del genoma completo y se compara contra una secuencia de referencia (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021)

- **Industrialización:** Otro inconveniente importante es la industrialización del tratamiento, debido a que se trata de una terapia personalizada. Además de su alto costo y complejidad de fabricación (Mirones et al., 2020).

Los CAR T que se han diseñado por el equipo del Dr. Carl June en Philadelphia, están patentados y por lo tanto su costo es de aproximadamente \$500 000. Por eso es que muchos centros de investigación en el mundo lo que han hecho es comenzar a diseñar sus propios CAR T y los prueban en diferentes ensayos clínicos, primero *in vitro* y luego en modelos murinos. Para luego hacer la fase en humanos. Este producto terapéutico “home made” podría tener un costo aproximado de \$250 000 (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021)

Desde el punto de vista técnico, el proceso de fabricación de cantidades suficientes de células T autólogas a menudo es difícil, especialmente en pacientes y bebés fuertemente pretratados que sufren de linfopenia relacionada con el tratamiento. Como solución a estas limitaciones,

se ha utilizado la edición genética para generar células T alogénicas universales CAR19 (UCART19) a partir de donantes sanos y así administrarlas como células CAR-T "listas para usar". UCART19 logró la remisión en dos bebés con LLA-B CD19+ refractario, junto con quimioterapia. La terapia UCART19 para adultos y niños está actualmente bajo investigación clínica (Britten et al., 2019).

Sin embargo, las UCART19 podrían presentar otros inconvenientes como alo-reactividad que puede conducir al rechazo de UCART mediado por las células T y NK receptoras, y esto puede conducir a enfermedad de injerto versus huésped (EIVH) (Goldsmith et al., 2020).

Con el conocimiento del TCR como el principal mediador de la EIVH, la interrupción del TCR a través de una de varias técnicas de edición de genes se ha convertido en el medio de prevención de la EIVH en UCART (Goldsmith et al., 2020).

Por ejemplo, se ha demostrado que anular el gen de la cadena  $\alpha$  constante del TCR (TRAC) utilizando tecnología de dedos de zinc, es viable para interrumpir el TCR, sin alterar la actividad antitumoral de las UCART. Otros métodos que se pueden utilizar son la tecnología de nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN) para desarrollar productos UCART y eliminar no solo el TCR, sino también el CD52, lo cual permite la linfodepleción para mejorar el injerto y la persistencia de UCART. La innovación de la tecnología CRISPR/Cas9 ha permitido la eliminación precisa de TRAC y antígenos específicos de células T (Goldsmith et al., 2020).

El Dr. Montero de la Universidad de Navarra se encuentra diseñando células CAR T CD33 alogénicas modificadas por medio de CRISPR para eliminar el HLA-1 y el TCR y de esta forma disminuir el riesgo de EIVH y el rechazo agudo (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

Otra estrategia es utilizar un gen suicida del virus del herpes simple-timidina quinasa (HSV-tk), que permite el agotamiento selectivo de las células que se expresan, tras la administración de un profármaco. En este caso, HSV-tk puede convertir el profármaco en un compuesto tóxico que detiene la replicación del ADN, lo que resulta en la muerte celular. Sin embargo, el uso de HSV-tk está limitado por la inmunogenicidad de la enzima viral y la latencia relativamente larga para la activación, la cual no es adecuada para controlar la toxicidad que

requiere una finalización inmediata. Un sistema suicida más avanzado emplea la co-expresión de la caspasa 9 inducible (iCasp9) en las células T. Esta construcción fusiona el dominio intracelular de la caspasa 9 (pro apoptótica) con un dominio de unión a fármaco. La administración de un fármaco de molécula sintética llamado AP1903 conduce a la dimerización de las proteínas de fusión y a la ablación rápida de las células T (Mardiana & Gill, 2020).

Se están llevando a cabo ensayos clínicos adicionales que utilizan estas células CAR T universales. Si bien este enfoque es prometedor, es importante señalar que todavía existe un riesgo de EIVH causado por un porcentaje muy pequeño de células TCR+ que pueden permanecer. Por tanto, la optimización de la delección de TCR durante la fabricación de células T con CAR sería un paso crucial para la aplicación clínica de las células CAR T (Mardiana & Gill, 2020).

Numerosos estudios también han evaluado posibles alternativas a las células CAR T que pueden ayudar a reducir el riesgo de EIVH. Hasta la fecha, la mayoría de las células CAR T utilizadas en la clínica están hechas de células T no seleccionadas, que consisten principalmente en células T  $\alpha\beta$ . Una opción atractiva es seleccionar un subconjunto de células T que tenga menos probabilidades de inducir EIVH para la fabricación de células T con CAR. (Mardiana & Gill, 2020).

De esta forma, los estudios han explorado la posibilidad de utilizar células T  $\gamma\delta$ , que a diferencia de las células T  $\alpha\beta$ , no son alorreactivas y no inducen EIVH. La incorporación de CAR en células  $\gamma\delta$  se reportó por primera vez en 2004 utilizando un CAR de primera generación específico para GD2. El estudio informó que se observó una elevada reactividad tumoral específica de antígeno (Mardiana & Gill, 2020).

Aunque las células  $\gamma\delta$  representan solo un pequeño porcentaje (aproximadamente el 5%) de las células T circulantes, en otro estudio que utilizó células T CAR dirigidas a GD2, se demostró que las células  $\gamma\delta$  podían expandirse y transducirse con éxito a números suficientes. Se demostró que la expresión de CAR por estas células  $\gamma\delta$  aumenta su citotoxicidad innata de una manera específica. Los datos acumulados sugieren que las células  $\gamma\delta$  pueden ofrecer una alternativa más segura a las células T  $\alpha\beta$  convencionales para el uso alogénico de las células T CAR. Sin embargo, puede haber funciones antitumorales y pro tumorales

diferenciales en diferentes subtipos de células  $\gamma\delta$ , lo que sugiere que la selección cuidadosa de los subconjuntos de células T  $\gamma\delta$  para usar en la manipulación de CAR será de gran importancia (Mardiana & Gill, 2020).

#### Recomendaciones posteriores a la infusión de células CAR T

Se recomienda la hospitalización del paciente con una estrecha monitorización durante al menos 7 días después de la infusión de células CAR-T. El monitoreo debe incluir la evaluación de los signos vitales al menos cada 4 horas y la revisión diaria de los sistemas orgánicos, examen físico, hemograma completo con diferencial, perfil metabólico completo, perfiles de coagulación y medición de los niveles séricos de PCR y ferritina (Neelapu et al., 2018).

Se debe controlar diariamente el equilibrio de líquidos y el peso corporal, y se recomienda la hidratación intravenosa de mantenimiento para todos los pacientes con CRS o en riesgo de desarrollarlo. De hecho, se recomienda el acceso venoso central, antes de la infusión de células CAR-T, para facilitar la administración oportuna de cualquier medicamento necesario para controlar las toxicidades (Brudno & Kochenderfer, 2019).

Los glóbulos rojos empacados y las plaquetas se pueden transfundir de acuerdo con las pautas institucionales estándar. Se deben evitar los corticosteroides para el tratamiento de la fiebre o para la premedicación antes de las transfusiones de sangre, con el fin de evitar limitar la eficacia de la terapia con células CAR-T. Sin embargo, se puede proporcionar un factor de crecimiento para la neutropenia (Neelapu et al., 2018).

Los corticosteroides también suprimen las respuestas inflamatorias y, por lo tanto, son eficaces en el manejo de CRS y SAM asociados con terapias celulares. Sin embargo, debido a que los corticosteroides inhiben la función de las células T y/o inducen la apoptosis de estas células, se debe evitar el uso de estos medicamentos para otras indicaciones (como premedicación para transfusiones de sangre, citadas anteriormente) después de la terapia adoptiva de células T. Por lo tanto, el uso de corticosteroides generalmente se considera solo cuando las toxicidades de la terapia con células CAR-T son refractarias a la terapia anti IL-6 (Neelapu et al., 2018).



Por otro lado, la gravedad de las toxicidades crónicas puede mitigarse introduciendo genes suicidas en el vector utilizado para la transferencia de genes CAR o permitir la co-expresión superficial de epítomos vinculantes para el agotamiento de anticuerpos, por ejemplo, EGFR, CD20 y caspasa 9 inducible (Almåsbaek et al., 2016).

La administración de anticuerpos o agentes de moléculas pequeñas inducen la apoptosis de las células transducidas. Una desventaja de estos sistemas es la correspondiente anulación de la eficacia anti-malignidad, por lo que pueden usarse de manera más apropiada en casos de toxicidad potencialmente mortal no controlada con inmunosupresión, o en el contexto de toxicidades continuas a largo plazo que ocurren cuando la remisión de la malignidad ya se ha producido. Se ha demostrado en ensayos clínicos que los sistemas suicidas agotan las células T alo-reativas después de un trasplante alogénico de células madre, aunque faltan datos clínicos sólidos de estos sistemas para la terapia con células T con CAR (Brudno & Kochenderfer, 2019).

Además, la toxicidad se puede controlar a varios niveles. Una forma es administrar el número requerido de células a través de dos o tres dosis. Otra forma es comenzar el tratamiento en las etapas más tempranas del desarrollo tumoral, antes de que el número de células cancerosas se vuelva demasiado alto (D'Aloia et al., 2018).

La gravedad de la toxicidad se ha correlacionado con niveles máximos más altos de células CAR-T CD4 + y CD8 + en sangre y concentraciones máximas más altas de IFN- $\gamma$  e IL-6 en suero. Estos datos implican que una estrategia de dosificación celular variable puede resultar óptima para el tratamiento con células CAR-T. Los pacientes con mayor carga tumoral pueden tratarse mejor inicialmente con una dosis baja de células CAR-T para minimizar la toxicidad, mientras que aquellos con menor carga tumoral pueden requerir dosis más altas o repetidas de células CAR-T para asegurar el reconocimiento de una carga mínima de antígeno tumoral (Turtle et al., 2016).

### **Capítulo III. Utilidad de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas mieloides**

Las neoplasias mieloides son enfermedades clonales de las células madre o progenitoras hematopoyéticas (HSPC) que surgen de cambios genéticos o epigenéticos, los cuales tienen

como resultado efectos deletéreos en vías críticas de diferenciación celular, proliferación y autorrenovación. Estas neoplasias malignas se pueden clasificar en síndromes mielodisplásicos, neoplasias mieloproliferativas y leucemia mieloide aguda (Mardiana & Gill, 2020).

Las indicaciones más comunes de alo-HCT en adultos son la leucemia mieloide aguda y el síndrome mielodisplásico. A pesar de las toxicidades asociadas con el trasplante en sí, la recaída sigue siendo la causa más importante de fracaso del tratamiento y muerte después de un alo-TCH, lo que destaca la necesidad de otras terapias que modifiquen la enfermedad sin toxicidad adicional (Goldsmith et al., 2020).

En el caso de la leucemia mieloide aguda (LMA), al igual que en otras neoplasias hematológicas, identificar la diana óptima sigue siendo un gran desafío. Estas dianas deben presentar ausencia de expresión superpuesta en tejidos normales, así como una baja expresión en células madre hematopoyéticas, con el fin de minimizar la toxicidad sistémica fuera del tumor. Además, deben expresarse en todas las células tumorales y presentar co-expresión para superar la heterogeneidad clonal y evitar el escape de antígeno (Pérez-Rojo, s. f.).

A diferencia de las neoplasias malignas de células B que expresan varios antígenos exclusivos del linaje de células B, como CD19, CD20, CD22 o BCMA en el caso del mieloma, la mayoría de los antígenos tumorales dirigidos a las neoplasias mieloides se comparten con una amplia gama de células sanas, incluidas las HSPC. Además, mientras que la aplasia de células B es clínicamente benigna y puede tratarse con infusiones de inmunoglobulina intravenosa, la mieloablación prolongada no es factible debido al riesgo de infección y dependencia de transfusiones (Mardiana & Gill, 2020).

El primer ensayo clínico que demostró la actividad biológica de las células CAR T en la LMA fue publicado en 2013. Se utilizó un CAR CD28- $\zeta$  de segunda generación dirigido contra el antígeno Y de Lewis. Aunque solo se observó una eficacia limitada, este fue un estudio importante dada su demostración de la actividad biológica de las células CAR T en pacientes con LMA en ausencia de toxicidad hematopoyética manifiesta (Mardiana & Gill, 2020).

Algunas de las posibles dianas de las células CAR T en LMA son:

- CD33: Es un receptor de membrana expresado en células mieloides. El 90% de los blastos lo expresan, aunque también lo hacen las células madre mieloides y células mieloides maduras no tumorales. Algunos científicos han intentado resolver el problema de mielotoxicidad mediante la eliminación de CD33 por medio de CRISPR/Cas9 en las células madre hematopoyéticas normales, para que sean resistentes a la terapia CAR T dirigida a CD33 (Pérez-Rojo, s. f.).

En un paciente con LMA refractaria CD33+, la infusión de células CAR-T condujo a una rápida degradación de los blastos en médula ósea dentro de las dos semanas posteriores a la infusión. Sin embargo, la recaída después de 9 semanas con blastos CD33+ aumentó gradualmente. A pesar de que las toxicidades clínicas observadas en el paciente eran controlables, se necesitan más datos de pacientes para validar el perfil de seguridad y eficacia de la terapia CD33 CAR-T. Más recientemente, con el fin de evitar posibles eventos adversos graves, se propuso combinar el trasplante alogénico de células madre CD33 knockout (KO) con terapia CART CD33 (Kim et al., 2018).

Lo anterior consiste en modificar genéticamente un aloinjerto para eliminar el antígeno diana del sistema hematopoyético normal y trasplantar este aloinjerto en secuencia con células CAR T derivadas de un donante contra el antígeno específico. La administración posterior de CAR T CD33 es capaz de eliminar eficazmente las células leucémicas, sin efectos notables fuera del objetivo. Aunque todavía no se ha desarrollado clínicamente, se espera que el concepto de combinar la terapia CAR T con alo-HCT modificado genéticamente de lugar a un efecto sinérgico sobre la LMA con toxicidades limitadas (Goldsmith et al., 2020).

En LMA, las células CAR T se están usando principalmente como un puente hacia el alo-HCT en sustitución de la quimioterapia convencional de acondicionamiento para trasplante. En estos casos, no es tan importante la persistencia, porque si las CAR T persisten mucho tiempo en el paciente, pueden destruir las células del alo-HCT (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

- CD123: Es la cadena transmembrana  $\alpha$  del receptor de IL-3. El 70% de las células de LMA expresan tanto CD33 como CD123, esto los convierte en objetivos interesantes para la terapia con células CAR T. Sin embargo, también existen problemas de mielotoxicidad (Pérez-Rojo, s. f.).

Una opción para reducir la mielotoxicidad es utilizar una célula CAR T CD123 que incorpore un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) para así poder inactivar las células con anticuerpos monoclonales contra EGFRt (Goldsmith et al., 2020).

Además, en la Universidad de Pensilvania, se completó recientemente un ensayo clínico de células CAR T CD123 fabricadas mediante electroporación de ARNm. Este método, en lugar de la transducción lentiviral, se eligió para prevenir la persistencia de células CAR T a largo plazo, evitando así el riesgo de mieloablación grave. Los pacientes con LMA refractaria recibieron quimioterapia linfodepletora antes del tratamiento con linfocitos CAR T de acción transitoria. En este estudio, aunque no se observaron respuestas antitumorales medibles, se encontró cierto nivel de bioactividad de las células, como lo demuestra el síndrome de liberación de citocinas y la fiebre que experimentaron todos los pacientes tratados. Es de destacar que no se informó toxicidad vascular, hematológica o neurológica manifiesta a pesar de la expresión del antígeno diana en tejidos hematopoyéticos sanos y algunos vasos sanguíneos de pequeño calibre (Mardiana & Gill, 2020).

- FLT3 (CD135): Se expresa aproximadamente en 20% de los pacientes con LMA y se caracteriza por presentar duplicaciones internas en tándem (FLT3-ITD). Varios estudios han demostrado que esta diana presenta una toxicidad más baja que otras similares. Además, se muestra una supervivencia significativamente prolongada en ratones con LMA FLT3 que reciben tratamiento con células CAR T FLT3 (Pérez-Rojo, s. f.).
- Receptor de folato  $\beta$  (FR $\beta$ ): Varios modelos preclínicos han demostrado la eficacia de las células CAR T contra esta diana sin toxicidad aparente contra las células madre hematopoyéticas sanas (Pérez-Rojo, s. f.).

- PR1/HLA-A2 y WT1/HLA-A2: Algunos antígenos asociados a leucemia se procesan intracelularmente y son presentados por el HLA clase II. Partiendo de esta premisa, se han desarrollado receptores CAR que mimeticen células T con dominio scFv contra un complejo péptido HLA. Uno de ellos es la proteinasa 1 (PR1), que es un nanómero restringido a HLA-A2 derivado de la proteinasa 3, la cual es un antígeno asociado a leucemia que se sobre expresa en blastos leucémicos mieloides. Las CAR T dirigidas a esta diana exhibieron citotoxicidad contra blastos de LMA en vitro (Mardiana & Gill, 2020).

Otro ejemplo es el antígeno tumoral de Wilms (WT1) en el contexto de HLA-A2, para el cual se ha demostrado eficacia in vivo en modelo de ratón con LMA (Pérez-Rojo, s. f.).

El uso clínico de las células T dirigidas a WT-1 se reportó recientemente en un estudio de terapia adoptiva basada en TCR. Este estudio intentó investigar si el riesgo de recaída de la LMA después del TCMH podría reducirse administrando a los pacientes de manera profiláctica células T dirigidas contra WT-1. Sorprendentemente, los doce pacientes que recibieron linfocitos T dirigidos contra WT-1 después de un TCMH tuvieron una tasa de supervivencia libre de recaída del 100% a una mediana de 44 meses después de la transferencia, que fue significativamente mayor en comparación con la tasa libre de recaída del 54% observada en un estudio adjunto (Mardiana & Gill, 2020).

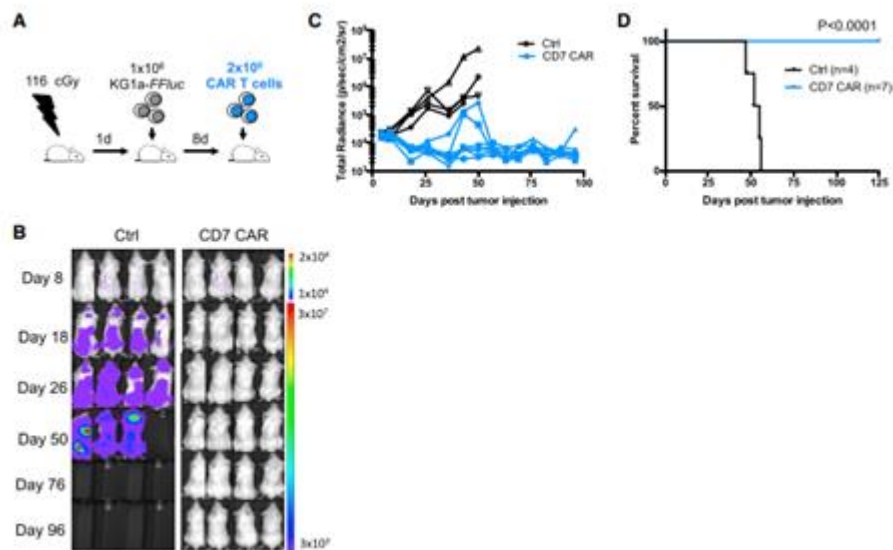
- CD7: es expresado por los blastos leucémicos y las células progenitoras malignas de aproximadamente el 30% de los pacientes con LMA, pero está ausente en las células mieloides y eritroides normales. Dado que la expresión de CD7 por blastos también está relacionada con la quimiorresistencia y malos resultados, apuntar a este antígeno puede ser beneficioso para este subconjunto de pacientes con LMA (Gomes-Silva et al., 2019, p. 7).

La expresión normal de CD7 se limita en gran medida a las células T, NK y sus precursores, donde actúa como receptor co-estimulador de las interacciones de los linfocitos T y B durante el desarrollo linfoide. El CD7 también se expresa en un subconjunto de progenitores mieloides en la sangre del cordón, aunque aún no se ha definido su papel en estas células (Gomes-Silva et al., 2019, p. 7).

Aunque el patrón de expresión de CD7 sugiere que puede usarse para atacar la LMA con alta selectividad y toxicidad limitada contra las células mieloides normales, su presencia en las células T normales significa que la expresión de un CAR CD7 en estas células no sería factible, ya que resultaría en suicidio celular. Por lo tanto, se desarrolló un medio para editar el gen CD7 (CD7KO) en las células T antes de la infusión de CAR CD7 y así retener la funcionalidad a través de su receptor nativo y quimérico. Estas células se han probado en un modelo in vitro de xenoinjerto de la enfermedad, sin una toxicidad evidente contra las células mieloides normales y los progenitores hematopoyéticos (Gomes-Silva et al., 2019).

La alteración del gen CD7 mediada por CRISPR / Cas9 en las células T antes de la transducción de CAR CD7 da como resultado la eliminación permanente del gen CD7 en el 85% -90% de las células T. Sin embargo, la edición del genoma no es la única forma de ocultar el CD7 de la superficie celular. Un informe reciente mostró que la proteína CD7 puede quedar "atrapada" dentro de la célula T cuando se une a un fragmento variable de cadena única (scFv) específico de CD7 diseñado y anclado en el retículo endoplásmico de la célula. Si bien tal método evitaría la necesidad de editar el genoma en las células T, la eficacia y viabilidad a largo plazo de ambos métodos para generar células T CAR CD7 resistentes al suicidio deben compararse en estudios clínicos (Gomes-Silva et al., 2019).

Las células CAR T CD7 protegen contra la LMA sistémica in vivo. Esto se demostró en un estudio realizado por Gomes et al. donde se evaluó la capacidad de las células CD7 CAR T para controlar la progresión de la LMA in vivo. Se utilizó un modelo de xenoinjerto de ratón de LMA en el que se injertaron ratones irradiados de forma subletal con una inyección intravenosa de células LMA que expresan luciferasa de luciérnaga (FFluc). Después de 8 días, se inyectó una dosis única de linfocitos T CAR CD7 a un grupo y de células T control a otro grupo. La carga tumoral se controló semanalmente mediante imágenes de luminiscencia in vivo. Los ratones que recibieron células T de control desarrollaron leucemia sistémica y todos sucumbieron a la enfermedad con una mediana de supervivencia de 54 días. Por el contrario, la inyección de células CAR T CD7 invirtió la progresión de la leucemia y no hubo un crecimiento tumoral observado durante la duración del experimento (Gomes-Silva et al., 2019).



**Figura 6.** A) Esquema general del experimento. Los ratones recibieron células KG-1a que expresaban FFluc 24 horas después de la irradiación subletal. Ocho días después, los ratones recibieron una única inyección de control o de células T CAR CD7 vía intravenosa y se monitoreo la progresión del tumor. (B) progresión de la leucemia en ratones individuales. (C) Cinética de la progresión de la leucemia en ratones individuales. (D) Curvas de Kaplan Meier que muestran la supervivencia de los ratones en cada grupo experimental (Gomes-Silva et al., 2019).

CD7 está ausente en la mayoría de las células mieloides y eritroides maduras normales, y no se observó toxicidad de las células CAR T CD7 contra monocitos periféricos o granulocitos después del cocultivo in vitro. Debido a que CD7 puede estar aumentado transitoriamente en algunos progenitores hematopoyéticos que están en sangre de cordón, se midió la actividad citolítica de las células CAR T CD7 contra estas células en cocultivo. Las células CAR T CD7 no tuvieron impacto en los recuentos de colonias monocíticas, granulocíticas y eritrocíticas en comparación con el cocultivo con células T de control. Estos datos indican que los progenitores mieloides y eritroides primitivos no son inhibidos por las células T CAR CD7 (Gomes-Silva et al., 2019).

Aunque el efecto previsto de las células T CAR CD7 sobre las células eritroides y mieloides no malignas es mínimo, se puede esperar la eliminación de las células T y NK CD7+

normales. La aplasia prolongada de estas células inmunitarias críticas puede llevar a inmunosupresión con aumento en el riesgo de infecciones virales y reactivación de virus latentes (Gomes-Silva et al., 2019).

Por tanto, las células CAR T CD7 pueden usarse como una terapia transitoria que permite el trasplante en pacientes con enfermedad refractaria o en recaída. En estos casos, la actividad transitoria de estas células minimizaría la carga tumoral y serviría como un puente hacia el trasplante curativo de células madre, el cual terminaría la actividad de las células CAR T y reestablecería la linfopoyesis normal. Para facilitar la actividad robusta pero transitoria de estas células, se ha utilizado un CAR de segunda generación con co-estimulación de CD28, el cual se ha demostrado en estudios clínicos que promueve una expansión rápida y una alta citotoxicidad con persistencia limitada. Como alternativa, las células T CD7 editadas resistentes al suicidio pueden sustituir a las células T normales y proporcionar protección contra patógenos que surgen comúnmente en pacientes con depleción de células T (Gomes-Silva et al., 2019).

Se necesitan estudios adicionales para evaluar si la coadministración de linfocitos resistentes al suicidio u otras estrategias para mitigar la aplasia de células T / NK podrían permitir la terapia de LMA con células CAR T CD7 fuera del entorno del trasplante de células madre (Gomes-Silva et al., 2019).

- CLL-1 (conocida como CLEC12A) también es un objetivo atractivo para las células CAR T debido a su alta expresión en la LMA y su ausencia reportada en las HSPC sanas, aunque se ha detectado en monocitos y en algunas células hematopoyéticas. Se ha informado que más del 60% de las muestras de LMA con expresión de CD33 también expresan CLL-1, lo que lleva a la posibilidad de crear células T CAR de doble especificidad para ambos antígenos (Mardiana & Gill, 2020).

Hay algunos neo antígenos que se han descrito en la LMA, incluidas mutaciones en las enzimas metabólicas IDH1 e IDH2, que están presentes en aproximadamente el 20% de los casos de LMA de novo. Además, la mutación en el gen NPM1 es también una de las alteraciones genéticas más frecuentes en LMA, y hasta un 60% de los pacientes con citogenética normal, tienen la mutación NPM1. La existencia de estos neo antígenos en



LMA, los convierte en un objetivo atractivo para la terapia con células T. Sin embargo, las proteínas codificadas por estas mutaciones asociadas a la enfermedad se expresan intracelularmente y, por lo tanto, no son accesibles al CAR (Mardiana & Gill, 2020).

El splicing desregulado también puede ser una fuente de neo antígenos, si da como resultado isoformas alternativas que se distinguen de su contraparte de tipo salvaje. Un estudio reciente informó que aproximadamente un tercio de los genes expresados en la LMA se someten a un splicing diferencial de ARN. En un estudio posterior del mismo grupo, se informó que la expresión de dos variantes de splicing novedosas, una para FLT3 y otra para NOTCH2, se encontraron en el 50 y el 73% de los casos de LMA, respectivamente, pero estuvieron ausentes en los donantes sanos. Además, se describió que surgía otra isoforma específica de LMA a partir de CD44, denominada variante CD44v6. En un estudio, más del 60% de los casos de LMA mostraron expresión de CD44v6, que no estaba presente en HSPC normal. A diferencia de otras mutaciones asociadas a enfermedades que se expresan intracelularmente, CD44v6 se expresa en la superficie celular, lo que lo hace accesible al CAR. De hecho, se generaron células CAR T dirigidas a la variante CD44v6 y se informó que ejercen fuertes respuestas antitumorales contra las células LMA, aparentemente al mismo tiempo que preservan el compartimento HSPC (Mardiana & Gill, 2020).

#### **Capítulo IV. Utilidad de las células CAR T en el tratamiento de las neoplasias hematológicas linfoides**

En los últimos años, los ensayos clínicos de varias instituciones para evaluar la terapia de células T modificadas por CAR para neoplasias malignas de células B como la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), el linfoma de células B no Hodgkin (LNHB), la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma de Hodgkin (LH) han demostrado resultados prometedores (Wang et al., 2017).

Estas células se dirigen a CD19, CD20, o CD30, donde se ha logrado un éxito mayormente convincente en células CAR-T específicas de CD19 para LLA-B con tasas de remisión completa (RC) altas de 70%-80% en estudios multicéntricos a 90% en estudios de un solo centro (Porter et al., 2018).

Las terapias con células CAR T dirigidas a CD19 han sido las más utilizadas y exitosas entre todos los receptores de antígenos quiméricos hasta la fecha (Ghosh et al., 2018).

### Leucemia linfoide aguda (LLA)

Más de 80 % de los niños diagnosticados con LLA-B se curan con quimioterapia intensiva. Pero para pacientes con recaídas después de la quimioterapia o de un trasplante de células madre, las opciones de tratamiento son prácticamente nulas. La leucemia linfoblástica aguda recidivante, de hecho, es una causa principal de muerte por cáncer infantil. De ahí la relevancia de las células CAR T (*Células T con CAR*, 2013a).

CD19 es un marcador clave del linaje de células B que se expresa casi universalmente en la leucemia linfoblástica aguda de células B recién diagnosticada (LLA-B). Las inmunoterapias dirigidas a CD19 inducen altas tasas de respuesta en la LLA-B en recaída/refractaria, en comparación con la quimioterapia de rescate (Porter et al., 2018).

Las inmunoterapias dirigidas a CD19 están disponibles comercialmente en Estados Unidos y otros países. Tisagenlecleucel es un producto de células CAR T que se dirige a CD19, mientras que blinatumomab es una proteína biespecífica que se acopla a las células T que se une tanto a CD3 como a CD19 (Pillai et al., 2019).

El Tisagenlecleucel fue aprobado por la FDA en el año 2017 para el tratamiento de LLA-B en recaída o refractaria en pacientes pediátricos y adultos jóvenes hasta de 25 años (Sánchez et al., 2018).

Hasta la fecha, no hay leucemia asociada a vectores con Tisagenlecleucel u otros productos de células T modificados por vectores. Tisagenlecleucel utiliza un diseño vectorial "autoinactivante" (SIN) que carece de potenciadores retrovirales, lo cual disminuye las probabilidades de activar genes cercanos y por tanto, el riesgo de oncogénesis (Bryan, s. f.).

Otra terapia aprobada por la FDA en 2017 es YESCARTA (axicabtagene ciloleucel). Estos son ahora un tratamiento de segunda línea para pacientes de hasta 25 años con LLA-B y para adultos con ciertos tipos de linfoma grande de células B (D'Aloia et al., 2018).

Aunque la tasa de respuesta inicial para la terapia con células CAR T es del 82% al 94%, las respuestas a largo plazo se ven afectadas por las recaídas. Se cree que las recaídas de CD19 están relacionadas con una mala persistencia o función de las células CAR T. Las recaídas de CD19- (negativo) se asocian con anomalías en la función y expresión del gen CD19. Sin embargo, no está claro si las recaídas de CD19- surgen de blastos CD19- preexistentes presentes en el momento de la infusión o si ocurren de novo bajo la presión del tratamiento (Pillai et al., 2019).

Se ha demostrado la heterogeneidad de la expresión de CD19 tanto en LLA-B de novo como en recaída. Aunque la mayoría de LLA-B muestra una expresión de CD19 de normal a alta, un subconjunto de casos tiene una expresión de CD19 tenue sin exposición a ninguna terapia dirigida a CD19. Se desconoce si la LLA-B con expresión de CD19 disminuida responderá tan bien a la terapia de células CAR T como lo hace la LLA-B con expresión de CD19. Aunque ningún caso de LLA-B de novo o recidivante es completamente negativo para CD19 en estudios anteriores, se han encontrado anomalías en CD19 después de la terapia con blinatumomab. Por lo tanto, tampoco está claro si la terapia previa con blinatumomab afecta las respuestas a la terapia posterior con células T CAR dirigida a CD19 (Pillai et al., 2019).

Todo esto se puede evaluar debido a que la función de las células CAR T y el estado de la enfermedad pueden ser analizados a partir de sangre periférica y médula ósea mediante la cuantificación de CD19 normal y aberrante que expresan células B y blastos. Las aberraciones de expresión de antígenos de LLA-B están bien descritas y forman la base del estudio de la enfermedad mínima residual mediante citometría de flujo. Por lo tanto, se pueden usar aberraciones únicas para seguir clones específicos desde el diagnóstico hasta la recaída (Pillai et al., 2019).

Las recaídas después del tratamiento con células CAR T dirigidas a CD22 se han asociado con una menor densidad de antígenos CD22. Sin embargo, en un estudio, las células que se dirigen a CD19 fueron igualmente efectivas para CD19-disminuido en comparación con CD19 normal o alto. Las diferencias entre células CAR CD19 y CD22 probablemente reflejen las diferencias en la expresión de antígenos, debido a que el CD19, se expresa más ampliamente que CD22 en LLA-B (Pillai et al., 2019).

Los precursores de células B aumentan su expresión de CD19 a medida que maduran. Datos in vivo demuestran que las células CAR T lisaron incluso los primeros precursores de células B tan pronto como comenzaron a expresar CD19. Los estudios in vitro confirmaron que las células CAR T eran capaces de reconocer y lisar las células diana que expresaban niveles muy bajos de CD19. Por lo tanto, la presencia de células con CD19 disminuida o CD19<sup>-</sup> por citometría de flujo no predice la falta de respuesta o la recurrencia después de la terapia con células T con CAR y no es una razón para considerar excluir a estos pacientes de recibir esta terapia. Los únicos casos de leucemia que pueden no responder son aquellos que son predominante o completamente negativos para CD19. CD19<sup>-</sup> LLA-B de novo es muy poco común, pero se ha reportado (Pillai et al., 2019).

Un escenario más común es la pérdida de CD19 debido al uso previo de inmunoterapia dirigida a CD19. Se encontró que los pacientes que habían sido tratados previamente con blinatumomab tenían una tasa de fracaso significativamente mayor para lograr la remisión. Curiosamente, solo un subconjunto de los pacientes tratados previamente con blinatumomab mostraron CD19 disminuido antes de la infusión de células T con CAR. Es posible que CD19 se reexpresara después de la interrupción del blinatumomab, o que hubiera otras anomalías en CD19 que no fueron evidentes mediante inmunofenotipificación de rutina. Las ventajas de la terapia con células CAR T en comparación con el blinatumomab incluyen una rápida expansión in vivo, una persistencia a largo plazo y una excelente penetración en lugares santuarios, como el sistema nervioso central. Se debe realizar un gran estudio multicéntrico de pacientes tratados con blinatumomab y CAR T para responder definitivamente a esta pregunta. Hasta entonces, hay que tener presente el impacto potencial de blinatumomab en la terapia posterior de células T con CAR (Pillai et al., 2019).

Las recurrencias de LLA CD19<sup>-</sup> forman la categoría más grande de recurrencias en muchos estudios, y estos pacientes tienen opciones de tratamiento limitadas. Se han descrito múltiples mecanismos de pérdida de CD19 que incluyen mutaciones y deleciones del gen CD19, retención de proteína mal plegada en el retículo endoplásmico y cambio de linaje. Una pregunta sin resolver es si los blastos con aberraciones en CD19 estaban presentes antes de la inmunoterapia. Se observaron transcripciones de fusión BCR-ABL1 en precursores de células madre hematopoyéticas CD19<sup>-</sup> antes y después de blinatumomab en 2 pacientes con

LLA-B con cromosoma Filadelfia que recayeron con leucemia mieloide CD19<sup>-</sup> (Pillai et al., 2019).

Otro estudio sugiere que, en algunos pacientes, la proteína CD19 está presente pero truncada, debido a un mecanismo de splicing, por lo tanto carece del epítipo que es necesario para desencadenar el reconocimiento de CART19 para la lisis y detección de CD19 por citometría de flujo (Ruella & Maus, 2016).

Además de los mecanismos genéticos previamente caracterizados, la trogocitosis del antígeno CD19 de las dianas a las células CAR T proporciona una explicación de la pérdida aislada de CD19 (Pillai et al., 2019).

Trogocitosis se refiere a una disminución de la expresión del antígeno en las células tumorales y la transferencia del antígeno a las células T, mediando así la muerte de las células T inducido por las células CAR T (Sidana & Shah, 2019).

Por lo anterior, el CD22 se propone como un objetivo alternativo para el diseño de CAR T para tratar a los pacientes con LLA-B CD19<sup>dim</sup> o CD19<sup>-</sup> que expresan CD22 después de la terapia con CD19 CAR-T. Aunque la terapia CD22 CAR-T ha demostrado una sólida actividad antileucémica y un perfil de seguridad similar al CD19 CAR-T, la recaída todavía se produce debido a la pérdida de la expresión superficial CD22. Un CAR T biespecífico dirigido tanto a CD19 como a CD22 podría superar la resistencia derivada de la pérdida de la expresión CD19 o CD22 (*Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies / Journal of Hematology & Oncology / Full Text, s. f.*).

Con respecto al alo-HCT, existe falta de consenso respecto a cuáles pacientes LLA-B deben proceder con un alo-HCT posterior a CART19. En diferentes ensayos clínicos de CART19, se decidió con base a la edad del paciente, la práctica institucional y la persistencia de las células CAR T (Goldsmith et al., 2020).

En cuanto a la persistencia, se prevé que la duración óptima de la persistencia de las células CAR T CD19 para la respuesta a la enfermedad sea de al menos 3-6 meses (Mardiana & Gill, 2020).

## Mieloma múltiple

El mieloma múltiple es la segunda malignidad hematológica más común en Estados Unidos. Si bien se han logrado avances en el tratamiento del mieloma múltiple, sigue siendo una neoplasia maligna muy mortal, especialmente entre los pacientes con enfermedad refractaria recidivante (Ghosh et al., 2018).

Se han reportado aproximadamente 3 años de mediana de supervivencia global en pacientes de alto riesgo (Marofi et al., 2021).

Los pacientes que se han vuelto refractarios a los inhibidores del proteasoma, los fármacos inmunomoduladores y el anticuerpo monoclonal anti-CD38 tienen malos resultados, con opciones de tratamiento restantes limitadas. La inmunoterapia con células T dirigidas a antígenos asociados al mieloma se encuentra en diversas etapas de desarrollo y ha generado una nueva esperanza de cura (Sidana & Shah, 2019).

El sistema inmune es muy importante en el control de MM, y un sistema inmunitario comprometido se asocia con una enfermedad más agresiva. Las células T reactivas a los antígenos asociados al mieloma son detectables y se correlacionan con la carga de morbilidad. Estas observaciones fomentan el desarrollo de estrategias basadas en células T transferidas para tratar el MM (Ghosh et al., 2018).

Se ha sugerido que la reducción de la intensidad de la quimioterapia en combinación con la transferencia adoptiva tardía de células T, en forma de infusión de linfocitos de donantes (DLI), puede conducir a efectos de injerto contra mieloma mientras se mitiga la enfermedad de injerto vs. huésped (EIVH). En un intento temprano, cuatro pacientes con MM avanzada fueron tratados con DLI dando lugar a respuestas en tres de los pacientes. A pesar de la respuesta y el quimerismo completo, la remisión no fue duradera y se produjo una recaída (Ghosh et al., 2018).

Con la llegada de agentes más nuevos, se han intentado terapias combinadas con DLI. La combinación de bortezomib y dexametasona antes de DLI sólo mostró respuestas modestas. En otro ensayo, la lenalidomida se utilizó como mantenimiento después de DLI y mostró

respuestas ligeramente mejores y mayor supervivencia libre de progresión en comparación con el mantenimiento de la lenalidomida sola (Ghosh et al., 2018).

Debido a la dificultad de separar el injerto-contra-mieloma y la EIVH con células T alogénicas no modificadas, se ha estudiado la transferencia de células T autólogas procesadas ex vivo. Estas células se transfirieron de forma adoptiva después de la estimulación y expansión in vitro durante 7 días en 22 pacientes con MM recidivante. Los pacientes fueron tratados con dosis altas de melfalán. Entre los pacientes tratados, la respuesta clínica global fue del 54% con una respuesta completa del 27% (sin paraproteína en orina o suero y <5% de células plasmáticas) y una respuesta parcial del 27% (Noonan et al., 2015).

Para obtener una respuesta más uniforme específica del mieloma, los antígenos asociados al mieloma han sido dirigidos a generar células T más específicas. Se han identificado varios antígenos asociados al mieloma (Ghosh et al., 2018).

El MAGE A3, es un antígeno canceroso (CTA) que se expresa en células de mieloma. Las células T han sido genéticamente diseñadas para expresar una afinidad mejorada TCR sintética (sTCR) dirigida a un complejo de péptido derivado de antígeno MAGE A3 / antígeno leucocitos humanos (HLA)-A01. Sin embargo, su uso ha sido restringido debido a la reactividad cruzada contra un péptido asociado a miocitos cardíacos, lo que conduce a toxicidad cardiovascular fatal en los dos primeros pacientes tratados. NY-ESO 1 es otro CTA expresada en múltiples cánceres. Los mielomas avanzados expresan NY-ESO-1 que es altamente inmunogénico. NY-ESOc259 es un sTCR mejorado por afinidad que reconoce el péptido derivado de NYESO-1 en el contexto de HLA-A0201. 20 pacientes fueron tratados en un ensayo con melfalán de alta dosis, y posterior administración de células T NY-ESOc259 transferidas de forma adoptiva. De ellos, 14 tenían CR, 2 pacientes tenían una muy buena respuesta parcial. Se vio persistencia a largo plazo que se correlacionó con la actividad clínica. Sin embargo, la eficacia inducida por la terapia de células T por sí misma en ambos casos se confunde con la administración conjunta de melfalán de alta dosis y trasplantes de células madre autólogos (Rapoport et al., 2015).

Por lo anterior, se empezó a investigar sobre posibles dianas terapéuticas para el uso de las células CAR T en el tratamiento del MM.

Las células de MM no expresan habitualmente CD19 detectable. Sin embargo, hay varios escenarios que se pueden imaginar en los que los pacientes con MM podrían beneficiarse de la terapia de células T con CAR dirigida a CD19. En primer lugar, es posible que las células MM expresen niveles bajos de CD19, por debajo del límite de detección mediante métodos de citometría de flujo e inmunohistoquímica de rutina, que pueden ser suficientes para la destrucción mediada por CAR. En segundo lugar, puede haber células progenitoras de MM que expresan CD19. En tercer lugar, puede haber células B reguladoras CD19<sup>+</sup> que desempeñan un papel de apoyo o inmunosupresor en el microambiente de MM, y la eliminación de esta población puede permitir un efecto antitumoral (Ghosh et al., 2018).

Existe un reporte de caso de un paciente con mieloma múltiple en remisión completa después de la terapia de células CAR T CD19 a pesar de la falta de expresión de CD19 detectable en el 99% de las células plasmáticas neoplásicas del paciente. Se presume que la respuesta es causada por la eliminación de una pequeña población de células madre de mieloma que expresan CD19 o por la eliminación de CD19 en células que desempeñan un papel crítico en el mantenimiento del crecimiento de las células del mieloma (Almåsbaek et al., 2016).

Se ha estudiado el uso de células CAR T CD19 como terapia de rescate en pacientes con MM refractario que habían recibido un trasplante autólogo de células madre. En este estudio, los pacientes fueron tratados con altas dosis de melfalán y un segundo trasplante, seguido de CTL019 (células CAR T CD19 transducidas con un lentivirus). Los resultados del primer paciente de este estudio fueron alentadores. La biopsia de médula ósea del día 100 no mostró células plasmáticas. Además, no se observó evidencia de síndrome de liberación de citoquinas. Un año después, el paciente no tenía evidencia de laboratorio ni signos o síntomas clínicos de MM. Curiosamente, en ese momento CTL019 no era detectable en sangre ni médula ósea y las células B CD19<sup>+</sup> no neoplásicas se habían reconstituido, lo cual sugiere que la actividad CAR se perdió o se redujo (Ghosh et al., 2018).

Se ha informado que tras la administración de melfalán en dosis altas y el trasplante autólogo de células madre, las células anti-CD19-CAR-T (CTL019) han surgido como una respuesta completa bien tolerada en los casos de MM refractario (Marofi et al., 2021).



Un inconveniente, previamente mencionado, es el desarrollo de hipogammaglobulinemia que conduce a inmunosupresión profunda. Dado que las células de mieloma están restringidas monoclonalmente para el subtipo de inmunoglobulina  $\kappa$  o  $\lambda$ , una estrategia puede ser apuntar al subtipo monoclonal de células B malignas sin afectar las células B normales (Ghosh et al., 2018).

En un ensayo, 7 pacientes con MM recibieron acondicionamiento con ciclofosfamida seguido de infusión de células T  $\kappa$  CAR. Las respuestas fueron modestas, 4 pacientes tuvieron como respuesta enfermedad estable. Se han obtenido mejores respuestas en enfermedades como LLC o LNH (Ramos et al., s. f.).

CD138 conocido como sindecano 1 es una molécula de adhesión que pertenece a la familia de los sindecanos de proteoglicanos heparán sulfato. Tiene un papel vital en la proliferación celular y el proceso de adhesión molecular. Generalmente, las células epiteliales, las células del músculo liso vascular y el endotelio expresan CD138; sin embargo, no se expresa en células T y B normales. Además, el CD138 se sobre expresa en las células MM, principalmente en casos de recaída. Por lo tanto, CD138 puede considerarse un candidato potencial y atractivo para apuntar en pacientes con MM (Marofi et al., 2021).

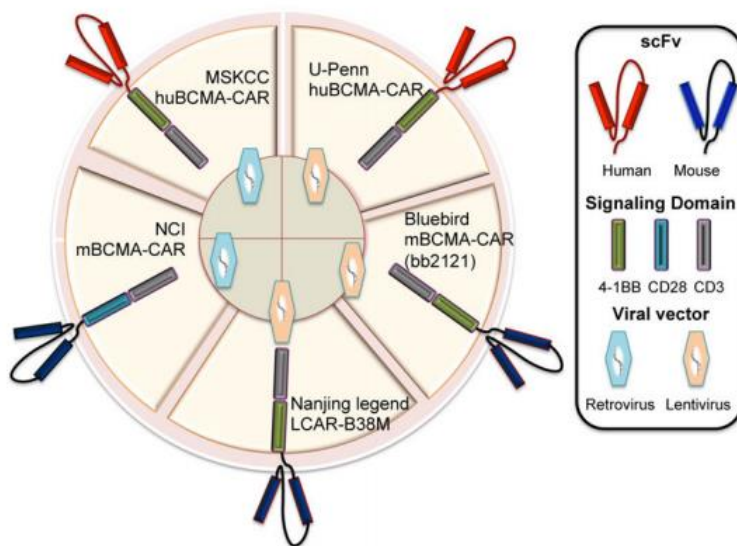
Se probó un CAR T dirigido a CD138 que incluía un dominio coestimulador 4-1BB en 5 pacientes con MM resistente en un ensayo fase uno. Se observó respuesta moderada en 3 pacientes. No se observaron toxicidades intolerables en este proceso, lo cual es sorprendente debido a su amplia expresión en células normales (Lin et al., 2019).

Los ensayos duales CD138 y BCMA, así como las pruebas CAR-T multiobjetivo están en curso (*Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies / Journal of Hematology & Oncology | Full Text*, s. f.).

El antígeno diana ideal en MM para la terapia con células T CAR sería con una molécula que se exprese en gran medida en la superficie de todas las células plasmáticas neoplásicas. El antígeno de maduración de células B (BCMA) es un buen candidato, debido a su expresión preferencial en células plasmáticas. (Ghosh et al., 2018). El gen BCMA está localizado en la banda cromosómica 16p13.13. Codifica un péptido con 184 residuos de aminoácidos y un peso molecular estimado de 20 kD. (Lin et al., 2019). BCMA es una superfamilia de

receptores TNF 17 (TNFRSF17) que juega un papel central en la regulación de la maduración y diferenciación de las células B en células plasmáticas. Es una proteína transmembrana de tipo III que carece de un péptido señal pero que contiene dominios extracelulares ricos en cisteína. No está presente en células B vírgenes ni en células madre hematopoyéticas. Inicialmente se creyó que BCMA no se expresaba en tejido no hematopoyético, pero datos recientes sugieren que el BCMA se expresa en forma anormal en líneas celulares de cáncer de pulmón. Afortunadamente, no hay evidencia de la expresión de esta molécula en tejido no hematopoyético esencial normal (Ghosh et al., 2018).

Un primer ensayo en humanos realizado en el NCI utilizó células T autólogas transducidas con un vector  $\gamma$  retroviral que codifica un CAR dirigido a BCMA. (Figura 6). El scFv de BCMA se deriva de un hibridoma murino e incluye un dominio coestimulador de CD28 humano. Sólo se trató a los pacientes con BCMA >50% por citometría de flujo y se excluyó al 30% de los pacientes debido a baja expresión de BCMA. Todos los pacientes recibieron quimioterapia de acondicionamiento con ciclofosfamida y fludarabina antes de la infusión celular. El informe inicial mostró que 2 de los 3 pacientes tratados con el nivel de dosis más alto tuvieron respuestas dramáticas, con una RC estricta. Sin embargo, esta dosis se asoció con alta toxicidad como síndrome de liberación de citoquinas (Lin et al., 2019).



**Figura 6.** *Los componentes de las células T BCMA-CAR. Un esquema que señala los componentes de los cinco CAR dirigidos a BCMA que se están probando actualmente en ensayos clínicos: NCI (Instituto Nacional del Cáncer); Bluebird (ensayo Bluebird Bio Multiinstitucional de b2121); U Penn (Universidad de Pennsylvania); MSKCC (Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering) (Lin et al., 2019).*

Cabe destacar que los ensayos biológicos de NCI y Bluebird utilizan un scFv derivado de hibridoma murino, mientras que los estudios UPenn y MSKCC utilizan un enfoque de detección de bibliotecas humanas para identificar scFv. El enfoque basado en bibliotecas humanas ofrece ventajas sobre el hibridoma de ratón. Se observa que la expansión después de la administración repetida de células CAR T está limitada en algunos pacientes por el desarrollo de respuestas inmunes scFv anti-murino. Las respuestas inmunes repetidas anti-CAR del huésped pueden ser menores contra los CAR de origen humano. Esto también puede mitigar la necesidad de un régimen de acondicionamiento fuerte como se vio en el ensayo UPenn huBCMA-CAR, donde se observaron ejemplos de eficacia impresionante sin el uso de quimioterapia acondicionadora previa. Además, una biblioteca ofrece a los investigadores una amplia selección de scFv para seleccionar un candidato superior (Turtle et al., 2016).

En MSKCC, se está trabajando el cuarto ensayo de fase I utilizando BCMA scFv identificado en bibliotecas humanas. El huBCMA-CAR de MKSCC es una construcción retroviral e incluye un dominio coestimulador 4-1BB. Los pacientes con MM que expresen cualquier nivel de positividad para BCMA (> 1%) son elegibles. El régimen de acondicionamiento es ciclofosfamida para la primera cohorte y los pacientes tratados en cohortes posteriores reciben además fludarabina (Ghosh et al., 2018).

En todos los ensayos informados, la resistencia a las células BCMA CAR T entre un grupo sustancial de pacientes sigue siendo un área de investigación activa. Aún no se ha entendido cómo la expresión de BCMA afecta la eficacia de la terapia de las células T CAR dirigidas a BCMA. Los diferentes umbrales de elegibilidad pueden tener un impacto en las tasas de respuesta y la durabilidad entre ensayos. Una vez que haya datos maduros, será importante considerar este factor al elegir las terapias para un paciente individual. Los mecanismos de resistencia aún no se comprenden bien, pero la aparición de células de mieloma BCMA negativas y los posibles requisitos de un umbral más alto de expresión de BCMA en la

superficie para una muerte óptima son pistas importantes. Los estudios inmunológicos en profundidad de la cinética de las células T en el medio del mieloma y los estudios sobre la expresión de BCMA en la superficie celular en los ensayos futuros serán de gran importancia para comprender el mecanismo de resistencia a las células T CAR dirigidas a BCMA (Ghosh et al., 2018).

El seguimiento de los pacientes tratados con BCMA CAR T dentro de estos ensayos aún está madurando, por lo que no está claro si se puede esperar una remisión duradera, como se observa en algunos pacientes con LLA-B y LNH. La supervivencia históricamente inconsistente en alo-HCT, combinados con la quimioterapia experimentada por el paciente típico con MM, sugieren que esta práctica probablemente será reemplazada por la terapia CAR T, si cumple su promesa de altas y duraderas respuestas. Es poco probable que CAR T se utilice como un puente para alo-HCT y ninguno de los ensayos ha informado de tal práctica en ningún participante (Goldsmith et al., 2020).

Además de los objetivos anteriores, existen candidatos adicionales para los CAR que se están explorando en etapas preclínicas y clínicas tempranas. CD38 (ADPribosil ciclasa) es una glicoproteína de tipo II y un antígeno de la superficie celular relacionado estructuralmente con proteínas como el receptor de transferrina y la molécula HLA. Se expresa constantemente en células plasmáticas malignas, lo que lo convierte en un objetivo atractivo para la terapia con células T con CAR. También se expresa en otros subtipos de células B y otros progenitores derivados de médula ósea, incluidos precursores mieloides y linfoides, y subtipos de células T (Marofi et al., 2021).

Daratumumab es un anticuerpo monoclonal dirigido a CD38, aprobado para el tratamiento de pacientes con MM refractario recidivante. La prometedora actividad de daratumumab en MM ha llevado a la evaluación de CAR T que se dirigen a CD38. En las pruebas preclínicas, los retrovirus dirigidos a CD38 han mostrado eficacia contra líneas celulares de mieloma derivadas de pacientes y en modelos de xenoinjerto. A pesar de lo prometedor, CD38 es un objetivo de CAR T menos ideal dado que se sabe que su expresión en células plasmáticas malignas disminuye y se pierde en las formas más agresivas, lo que aumenta la probabilidad de resistencia. Además, CD38 también se expresa en tejidos no hematopoyéticos normales, incluidas las células epiteliales de la próstata, y aunque el anticuerpo es seguro para su uso

en pacientes, el potencial más potente de las células CAR T no garantiza la seguridad cuando se dirige a esta proteína ampliamente expresada (Marofi et al., 2021).

Para abordar los problemas de seguridad, se han diseñado CAR T con scFv de menor afinidad, lo cual produce una mejor capacidad discriminatoria entre las células MM y las células normales sin pérdida significativa de expansión, persistencia y potencial citotóxico. Además, se está explorando la doble especificidad CD38/BCMA CAR T (*Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies | Journal of Hematology & Oncology | Full Text*, s. f.).

SLAMF7 (molécula de activación de linfocitos de señalización F7) se expresa ampliamente en células plasmáticas, así como en subconjuntos de células B y T normales, células NK, monocitos y células dendríticas, y ya es un objetivo terapéutico del anticuerpo monoclonal elotuzumab. Las células CAR T dirigidas contra SLAMF7 han mostrado una actividad preclínica prometedora. Sin embargo, debido a que SLAMF7 se expresa en células inmunes normales, esto puede resultar un desafío en la aplicación clínica de tales células CAR T. Se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase 1 (NCT03710421) (Sidana & Shah, 2019).

Para contrarrestar los efectos tóxicos que se podrían generar, en el ensayo NCT03710421 se generaron células SLAMF7-CAR-T que contenían el ScFv anti-SLAMF7 y una molécula de EGFR truncada (EGFRt) contra células MM. Se observó que los eventos adversos graves mediados por el sistema inmunitario después de la administración de células CAR T se atenuaron con cetuximab (anticuerpo monoclonal EGFR) al inducir el suicidio de las células CAR-T mediante un interruptor de seguridad basado en anticuerpos (Marofi et al., 2021).

GPRC5D se expresa en células plasmáticas, así como en algunas células normales, como el folículo piloso y el tejido pulmonar. Es importante destacar que la expresión en las células plasmáticas es de 500 a 1000 veces mayor que la que se encuentra en otras células. Las células CAR T desarrolladas contra GPRC5D han mostrado una actividad preclínica alentadora (Sidana & Shah, 2019).

Se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con MM con células CAR-T dirigidas por BCMA puede experimentar recaída de pérdida de antígeno en el modelo de escape de

antígeno BCMA murino. Esto podría mejorar utilizando las células GPRC5D-CAR-T. En consecuencia, se ha diseñado un ensayo clínico de fase I para investigar la eficacia de la terapia con células GPRC5D-CAR-T en pacientes con RRMM después de la terapia con células CAR-T dirigida por BCMA (Marofi et al., 2021).

El receptor NKG2D activa las células NK y los subconjuntos de células T después de unirse a un grupo de ligandos que se expresan en las células infectadas y en una variedad de células tumorales, incluido el MM. Es importante destacar que no se ha observado una expresión significativa en tejidos sanos normales. Se han estudiado las células T CAR dirigidas a NKG2D en una pequeña cohorte de pacientes con MM, y también se han desarrollado células CAR NK dirigidas a NKG2D con actividad preclínica prometedora en MM. Cinco pacientes de MM fueron tratados en un ensayo de fase I de células T CAR dirigidas a ligandos NKG2D. No se observó síndrome de liberación de citoquinas ni neurotoxicidad (Sidana & Shah, 2019).

Otros enfoques CAR han incluido el direccionamiento específico de isoformas de antígenos ampliamente expresados. La variante de isoforma 6 (CD44v6) es el principal receptor de hialuronato que comúnmente se sobre expresa en una variedad de malignidades hematológicas que incluyen células de mieloma. Se ha evidenciado su expresión en 43% de los pacientes con MM, principalmente en casos avanzados. CD44v6 es un candidato adecuado para ser diana de anticuerpos monoclonales y células CAR T. En un estudio, han diseñado las células CD44v6-CAR-T para que se dirijan a las células tumorales en pacientes con leucemia mieloide aguda y MM. Las células CD44v6-CAR-T demostraron la mayor función antitumoral contra las células MM sin efectos tóxicos sobre las células madre hematopoyéticas (Marofi et al., 2021).

En otro enfoque interesante, las células T CAR que se dirijan a CD70, el cual se expresa en diversas neoplasias malignas de células B, incluyendo MM, destruyeron líneas de células tumorales positivas para CD70 y tumores primarios. CD70 es un ligando natural de CD27 y el CAR diseñado consistió en CD27 como el dominio de reconocimiento de antígeno fusionado al dominio intracelular de la cadena CD3- $\zeta$ . Sin embargo, CD70, no se utiliza ampliamente en pacientes con MM, debido a que su expresión en MM es baja y muy variable (Ghosh et al., 2018).

CD56 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se identifica como una glicoproteína de la superficie celular con funciones reguladoras en la interacción célula-célula y célula-matriz. El CD56 se expresa generalmente en células T activadas sanas, células NK, células epiteliales y células neurales, pero no en células plasmáticas normales. Además, la sobreexpresión de CD56 en las células plasmáticas tumorales se ha documentado en más del 78% de los pacientes con MM. Se han creado anticuerpos monoclonales anti CD56 para dirigirse a células MM CD56+. Por ejemplo, un mAb humanizado llamado HuN901 demostró una citotoxicidad antitumoral eficaz en estudios in vitro e in vivo. Sin embargo, existe la posibilidad de riesgos de infección ya que provoca el agotamiento de las células efectoras inmunes CD56 +. Se han diseñado células CAR-T CD56, pero debido a que CD56 se expresa en los sistemas nerviosos central y periférico, la toxicidad neurológica puede considerarse una preocupación al usar células CD56-CAR-T (Marofi et al., 2021).

Los CAR que se están probando en MM no se han limitado solamente a las células T. Las células Natural Killer (NK) transducidas por medio de un retrovirus con CAR que se dirigen a SLAMF7 (CS1), han demostrado capacidad para lisar modelos in vitro y xenogénicos de MM (Ghosh et al., 2018).

Las células NK podrían tener la ventaja de un inmunofenotipo natural de mayor ataque y podría generar menor cantidad de efectos adversos en comparación con los linfocitos T (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021)

Con los avances en terapia celular que se han logrado para el MM, se está cuestionando el papel del alotrasplante de médula ósea (aloHCT). La mayoría de los ensayos clínicos con células CAR T excluyen a pacientes que se han sometido a un aloHCT previo, lo cual limita las opciones de tratamiento para estos pacientes con alto riesgo. Por lo tanto, no tener la opción de recibir células T CAR en los ensayos clínicos puede influir en los pacientes y sus médicos para que busquen una terapia experimental con células T CAR antes de aloHCT. Sin embargo, hasta la fecha, los datos no están claros si las células CAR T pueden reemplazar al aloHCT como terapia curativa (Ghosh et al., 2018).

La relevancia del aloHCT es su potencial para curar MM refractario con una combinación de quimioterapia de dosis alta, células hematopoyéticas libres de tumor y efecto injerto contra

mieloma. Los estudios preclínicos con aloHCT se han centrado en el desarrollo de productos de células de donante modificadas genéticamente que pueden mejorar los efectos antitumorales a través de las barreras HLA con una mortalidad mínima relacionada con el trasplante. Los estudios en modelos de ratón de aloHCT sugieren que al optimizar el tiempo de la transferencia adoptiva y el direccionamiento específico de las funciones efectoras de las células T, se pueden lograr efectos antitumorales mejorados de las células T del donante sin aumentar la EIVH. Por lo tanto, aloHCT puede desarrollarse como una plataforma para la terapia del mieloma refractario recidivante para terapias basadas en CAR. Los datos preclínicos y clínicos con células T con CAR CD19 derivadas de un donante sugieren que, en un entorno alogénico, la estimulación simultánea de CAR y TCR alorreactivo puede eliminar la población de células T del donante que causan EIVH mientras retiene las células T que expresan CAR no alorreactivo que pueden mediar los efectos antitumorales (Ghosh et al., 2018).

La comprensión reciente del desarrollo de las células T ha impulsado las perspectivas de utilizar células progenitoras de células T para mejorar la reconstitución inmunitaria postrasplante. Dado que los progenitores de células T del donante se someten a una mayor educación en el timo del huésped, se desarrolla la tolerancia dirigida al huésped, lo que minimiza el riesgo de EIVH. Los progenitores de células T se pueden diseñar adicionalmente para expresar CAR. En los seres humanos, los progenitores de células T derivadas del cordón umbilical que expresan CAR se han mostrado prometedores en estudios preclínicos y se puede esperar que sean valiosos en el desarrollo de terapias con células anti-mieloma (Ghosh et al., 2018).

Aunque el MM es susceptible a inmunoterapia en forma de aloHCT y transferencia de células T adoptivas dirigidas al mieloma, el desarrollo de resistencia y la falta de respuestas óptimas siguen siendo problemáticos. Además de la identificación de más objetivos para los CAR, los esfuerzos también se centran en identificar los mecanismos de la resistencia intrínseca del mieloma a la muerte mediada por células T y modificar las células T para superar la resistencia (Ghosh et al., 2018).

Un mecanismo potencial de recaída después de la terapia con células T CAR es el escape de antígeno.

Con el paso del tiempo, las células tumorales regulan negativamente la expresión del



antígeno diana o expresan un epítipo diferente al que está dirigido la célula CAR T. Esto se ha descrito en la terapia con células T CAR CD19 y también se observado en el mieloma. También se ha observado una selección positiva de células clonales que expresan a priori un epítipo diferente. De manera similar, los tumores pueden exhibir trogocitosis (Sidana & Shah, 2019).

Las estrategias para mitigar el escape de antígenos o la migración de epítopos incluyen dirigirse a más de un antígeno para aumentar la eficacia. Esto se puede lograr con células T duales células T CAR biespecíficas. Un ensayo en fase 1 en China evaluó infusiones separadas de linfocitos T CAR dirigidos a CD19 y BCMA después del trasplante de células madre en pacientes de alto riesgo al comienzo del curso de la enfermedad. No se observó toxicidad excesiva o inusual (Sidana & Shah, 2019).

El agotamiento o senescencia de las células T es una característica distintiva de las recaídas del mieloma. Al igual que con las células T endógenas, el eje PD1/PDL-1 puede atenuar la actividad de las células T específicas del mieloma. PDL-1 es expresado por células del mieloma y la médula ósea del mieloma induce su expresión. Como un agente único, la inhibición de PD1 en MM refractario recidivante ha mostrado respuestas subóptimas en dos estudios pequeños. Sin embargo, la observación de enfermedad estable en el 63% de la población con MM refractaria sugiere una eficacia potencial. Se están realizando ensayos clínicos para explorar la eficacia de la inhibición de PD-1/PD-L1 en combinación con inhibidores del proteasoma y agentes inmunomoduladores (Ghosh et al., 2018).

No obstante, la combinación del bloqueo de puntos de control inmunológico con la terapia celular adoptiva es una posibilidad. En modelos de sarcoma y cáncer de mama de ratón, la combinación de bloqueo de PD-1 con células T CAR murinas mostró efectos antitumorales significativamente mejorados en comparación con cualquiera de las intervenciones solas. La combinación de células CAR T y el bloqueo de puntos de control inmunológico se espera que demuestre ser sinérgica en estudios en humanos (John et al., 2013).

Se sabe que el MM tiene un microambiente inmunosupresor complejo que consiste en tipos de células inmunosupresoras reclutadas y un medio de citocinas inmunosupresoras que deteriora la actividad de las células TH1 pro-inmunes y restringe la inmunidad de las células

T antitumorales. Si bien la capacidad específica de antígeno de las células CAR T se está explotando con el descubrimiento de dianas específicas del mieloma, la optimización de la señalización y la citólisis de las CAR T aún no se ha explorado completamente. Las células T CAR blindadas representan la próxima generación de optimización que se centra en el refuerzo de las células T CAR modificadas contra las influencias de un microambiente tumoral inmunosupresor. Las estrategias de los CAR blindados han abarcado la ingeniería de la producción de citocinas endógenas y la mejora de los efectos coestimuladores (Ghosh et al., 2018).

El lapso entre la recolección y la fabricación de células CAR T autólogas sigue siendo un desafío para los pacientes con enfermedad progresiva. Las células T alogénicas de donantes sanos pueden proporcionar células CAR T listas para usar. Un producto de células T con CAR alogénico dirigido a BCMA ha mostrado una actividad preclínica prometedora en xenoinjertos de MM, in vitro y en ratones. Para reducir el potencial de enfermedad de injerto contra huésped, estas células CAR T se han editado genéticamente utilizando nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) para eliminar el gen TRAC. El gen CD52 también se ha eliminado para permitir la linfodepleción selectiva de los linfocitos del huésped con un anticuerpo anti-CD52 (Ghosh et al., 2018).

### Linfomas

Se han realizado estudios con células CAR T dirigidas hacia el CD30, antígeno que es altamente expresado por las células tumorales en linfoma de Hodgkin (LH) y linfoma anaplásico de células grandes (LACG). En un estudio, se evaluaron 9 pacientes con LH y LACG recidivantes, a los cuales se les aplicaron linfocitos T autólogos que fueron genéticamente modificados gracias a la utilización de un retrovirus, expresando un CAR con dominios de coestimulación tipo CD28. De los siete pacientes con LH, uno tuvo RC al tratamiento después de la segunda infusión de dichas células que duró más de dos años y medio, otro también obtuvo RC de menos de dos años de duración y 3 continuaron su enfermedad de manera estable. De los dos pacientes diagnosticados con LACG, solo uno tuvo una respuesta completa con una duración de nueve meses después de la cuarta infusión de células CAR T. Además, se observó que a pesar de que una pequeña parte de los linfocitos B y T activados expresaban este antígeno normalmente, en ninguno de los pacientes se

presentaron cambios en los niveles de dichas células, ni desarrollaron infecciones que pudieran hacer sospechar su depleción (Sánchez et al., 2018).

En presencia de rituximab, la combinación de CAR T anti-CD19 y anti-CD38 ha mostrado citotoxicidad sinérgica contra linfomas no Hodgkin (LNH) in vitro y en xenoinjertos, proporcionando una poderosa razón para la evaluación clínica de CD38 CAR T y/o CD19 CAR T en el tratamiento de pacientes con LNH en recaída después de la terapia rituximab (*Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies | Journal of Hematology & Oncology | Full Text*, s. f.).

Tanto el tisagenlecleucel como el axicabtagene ciloleucel están aprobados por la FDA para los subtipos de linfoma difuso de células B después de 2 o más líneas de tratamiento anteriores (Brudno & Kochenderfer, 2019).

Los ensayos clínicos que se han realizado con axicabtagene ciloleucel han producido buenos resultados, con una sobrevida a los 5 años del 80% (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021)

Para el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) el paradigma de tratamiento en recaída temprana o refractario implica quimioterapia de rescate seguida de trasplante autólogo de células madre (ASCT). Históricamente, la consolidación de alo-HCT después de un régimen de rescate inicial se asoció con una menor incidencia de recaídas en comparación con el ASCT, pero fue más tóxico (Goldsmith et al., 2020).

Aunque faltan comparaciones directas con alo-HCT y el seguimiento aún es limitado, los datos de los principales ensayos de la terapia CD19 CAR T para el LDCBG recidivante/refractario y los registros a nivel mundial, sugieren tasas de RC duraderas del 30 al 40% con toxicidades relacionadas al tratamiento más benignas y de carácter agudo (Goldsmith et al., 2020).

Con una eficacia comparable o mejorada en relación con el alo-HCT y toxicidades que parecen más tolerables y de duración limitada, la terapia con CAR T probablemente ha reemplazado al alo-HCT para el tratamiento del LDCBG con recaídas múltiples (Goldsmith et al., 2020).

Además del axicel y tisagenlecleucel, otro producto de células T CAR, lisocabtagene maraleuce, se encuentra en ensayos clínicos. También está mostrando resultados prometedores y es el único producto que puede corregir la proporción infundida de células T CD4 + y CD8 + (Zhou et al., 2020).

El uso de las CAR T ha planteado desafíos a nivel de diagnóstico patológico, debido a que la mayoría de los patólogos no están familiarizados con las características morfológicas que se pueden encontrar. Microscópicamente, las células T infundidas se activan y, por lo tanto, muestran atipia citológica, como núcleos irregulares y de mayor tamaño, con una expresión generalmente muy alta del índice proliferativo (Ki-67). Además, las células T atípicas que proliferaron suelen dar lugar a estructuras ganglionares normales borradas, afectación angiocéntrica y lesiones linfoepiteliales (LEL). Todas estas características pueden hacer que el patólogo otorgue fácilmente un diagnóstico erróneo de linfomas de células T. En comparación con las muestras después del tratamiento con R-CHOP, el diagnóstico de LDCBG después de la terapia con células CAR T parece más desafiante (Zhou et al., 2020).

La evaluación patológica después de la terapia con células T CAR es de importancia para proporcionar el nivel patológico de evidencia, incluido el éxito o no en la infusión de células T CAR; información de detalles de la expansión y persistencia de las células T; evaluación de la eficacia terapéutica de un individuo; determinación de la recaída o progresión de la enfermedad; y seguimiento del proceso concreto de evolución o implicación (Zhou et al., 2020).

El linfoma de células del manto, aunque es poco común, es un desafío único porque invariablemente recae después de la terapia inicial con inducción y consolidación del ASCT, su curso clínico es a menudo agresivo y con frecuencia se vuelve refractario a la quimioterapia y agentes nuevos. Aunque las terapias novedosas como los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) tienen una supervivencia prolongada, la progresión a menudo es inevitable y se asocia con una supervivencia deficiente. El alo HCT se ha ofrecido como una opción potencialmente curativa, aunque la llegada de numerosos agentes dirigidos ha proporcionado respuestas más prolongadas (Goldsmith et al., 2020).

No hay datos aún que comparen alo HCT con CAR-T en estos pacientes y actualmente no hay seguimiento a largo plazo después de CAR-T. Si CAR-T da como resultado un 30% o más de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo, probablemente se considerará superior a alo HCT en estos pacientes (Goldsmith et al., 2020).

El linfoma folicular (LF) es el segundo LNH más común y el linfoma indolente más común. Los pacientes tienen un curso variable, pero generalmente la enfermedad se considera incurable y muchos pacientes reciben múltiples líneas de terapia durante su curso. En ausencia de enfermedad transformada y en aquellos que son elegibles para trasplante, muchos se someterán a quimioinmunoterapia de rescate con la intención de someterse a quimioterapia de dosis alta con ASCT. El alo-HCT de donante de hermanos compatibles proporciona una supervivencia a largo plazo comparable a la del ASCT, con un riesgo de recaída significativamente menor pero mayor mortalidad no asociada a recaída. La inclusión de las células CAR T, está disminuyendo el uso y la utilidad de alo-HCT (Goldsmith et al., 2020).

Entre los pacientes tratados en el estudio prospectivo de CTL019 / tisagenlecleucel de la Universidad de Pensilvania, 14 pacientes que recibieron el tratamiento tenían LF avanzado, 8 de los cuales tenían enfermedad doble refractaria, 3 se habían sometido a un ASCT previo y 1 alo-HCT. 10 de esos 14 pacientes tuvieron una RC a los 6 meses y permanecieron en remisión con una mediana de 2 años. Se produjo síndrome de liberación de citoquinas grave en cinco pacientes (Schuster et al., 2017).

En un estudio del Instituto del Cáncer Fred Hutchison incluyeron a 8 pacientes con LF con recaídas múltiples (3 con un ASCT previo y 1 con un alo-HCT previo) para recibir tratamiento con CAR T 19. Siete lograron una RC, todos los cuales permanecieron en remisión y uno de los cuales procedió a alo-HCT. El 50% de los pacientes tuvo síndrome de liberación de citoquinas, pero sin gravedad (Hirayama et al., 2019).

Si bien las altas tasas de respuesta y las toxicidades manejables son prometedoras en el LF recurrente múltiple, la duración del seguimiento en estos ensayos es limitada. Por lo tanto, se desconoce si la terapia CAR T se comparará favorable o desfavorablemente con alo-HCT, ya que CAR T debería proporcionar una progresión libre de enfermedad duradera del 70% o mejor para ser un sustituto competitivo de alo-HCT (Goldsmith et al., 2020).

A diferencia de la LLA-B, la evidencia actual no respalda el alo-TCH de consolidación para los pacientes con LNH que responden a la terapia CAR T. Además, como las respuestas pueden retrasarse y evolucionar durante un período prolongado, generalmente se recomienda la observación activa (Goldsmith et al., 2020).

Además, el trasplante alogénico probablemente erradica las células CAR T. En caso de progresión, más bien debería considerarse una estimulación de las células CAR T para intentar obtener una respuesta. La lenalidomida y el anticuerpo monoclonal biespecífico CD3-CD20 mosunetuzumab han demostrado el potencial de recapturar una respuesta en pacientes que progresaron después de la terapia con CAR T (Goldsmith et al., 2020).

En resumen, mientras que CAR T CD19 posiblemente tiene un papel complementario en la vinculación con alo-HCT en LLA-B; puede suplantar al alo-HCT en la mayoría de los pacientes con LNH recidivante en base a una toxicidad favorable y al menos una eficacia comparable. Se necesita un seguimiento más prolongado en la mayoría de los ensayos NHL CAR T para confirmar esta implicación (Goldsmith et al., 2020).

### Células CAR NK

Actualmente, se investiga sobre la utilización de linfocitos NK para el tratamiento de leucemias y linfomas tipo T, en los cuales no se ha logrado gran avance con las células CAR T debido a la similitud de antígenos de superficie entre las células T normales y las malignas. Gracias a que el antígeno CD5 no se encuentra en los linfocitos NK, pero sí en células T normales, es posible utilizar dichas células para la construcción de CAR CD5 en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) y linfomas de células T periféricas (LCTP), ya que este antígeno está altamente expresado en ambas enfermedades. De las investigaciones anteriores con una línea de NK humana (NK-92) se encontró que las células NK CAR CD5 tenían actividad antitumoral potente y específica contra varias líneas de células T, leucemia de linfocitos T y células tumorales primarias; además de demostrar *in vivo* en modelo murino la capacidad para inhibir y controlar la progresión del cáncer (Sánchez et al., 2018).

Es de destacar que el número insuficiente de células NK que se puede usar para terapia, así como su falta de persistencia in vivo, han planteado durante mucho tiempo una limitación significativa en los enfoques terapéuticos basados en células NK. De manera alentadora, una publicación reciente informó que la inclusión del transgén de IL-15 puede conducir a una expansión exitosa de las células CAR-NK derivadas de la sangre del cordón umbilical (Mardiana & Gill, 2020).

### Leucemias con rearreglo MLL (r-MLL)

Para los pacientes con r-MLL, cuyas manifestaciones citogenéticas y fenotípicas son variables, el tratamiento con CAR-T ofrece la oportunidad de la medicina personalizada mediante la identificación del objetivo clave para cada paciente (Britten et al., 2019).

La pérdida del antígeno CD19 y el escape inmune es un obstáculo importante para los pacientes con r-MLL y especialmente para el subtipo t (4;11). Se han propuesto varios mecanismos para la pérdida de antígenos CD19, incluyendo mutaciones o empalme alternativo de CD19, enmascaramiento antigénico e interruptor de linaje. Se ha demostrado que la naturaleza bifenotípica de las leucemias MLL-r confiere la capacidad de cambiar entre linajes en células leucémicas afectadas bajo presión selectiva. Se han observado transiciones fenotípicas de linfoide a mieloide y más raramente de mieloide a linfoide, después de quimioterapia y trasplante de células madre, y recientemente, después de la administración de CD19 CAR-T (Britten et al., 2019).

Se cree que un cambio posterior al linaje mieloide es el resultado de eventos mutacionales adicionales que anulan la identidad linfoide. De hecho, la pérdida de CD19 por sí sola no es suficiente para inducir el interruptor de linaje. La susceptibilidad de los pacientes con MLL-r al interruptor de linaje también podría atribuirse al aumento intrínseco de la plasticidad de linaje de la célula de origen leucémica MLL-r, ya que la translocación de t (4;11) se produce en una etapa progenitora temprana no comprometida (Britten et al., 2019).

El interruptor de linaje en recaída (independientemente de las terapias CD19) se ha asociado con la presencia de un clon pre-leucémico oculto y multipotente que sigue el linaje mieloide sobre el linfoide mediante la adquisición de nuevas aberraciones genéticas, que

recientemente se han relacionado con una desregulación epigenética que afecta a los programas transcripcionales responsables de la identidad del linaje. En el caso de la terapia post-CD19 CAR-T, queda por dilucidar si el escape inmune CD19 observado es un mecanismo único en respuesta específicamente a CAR-T. Por ejemplo, esto puede estar asociado con alteraciones inmunológicas específicas en el microambiente de médula ósea que confieren un nuevo contexto y posiblemente ventaja clonal a las poblaciones CD19-, lo cual está respaldado por las observaciones de que el microambiente es capaz de modular la identidad del linaje y la oncogenicidad en la leucemia MLL-r (Britten et al., 2019).

Una posibilidad interesante es que un efecto secundario común de CAR-T, el síndrome de liberación de citoquinas (CRS), podría sentar las bases para el interruptor de linaje mieloide. Además, hay evidencia *in vitro* en líneas celulares t(4;11), de que la exposición a altos niveles de citoquinas, como la interleucina 6 (IL-6), es capaz de inducir la diferenciación mieloide (Britten et al., 2019).

Curiosamente, aunque CD19 es un marcador característico en la leucemia MLL-r, no parece ser indispensable para el fenotipo maligno t(4;11). Este concepto puede ser aplicable en el diseño de la próxima generación de terapias CAR-T con el fin de identificar los antígenos más apropiados más allá de CD19 para el grupo MLL-r. La co-expresión de los antígenos mieloides podría calificar a los pacientes t(4;11) (así como a otros grupos MLL-r) para futuras intervenciones CAR-T orientadas a múltiples objetivos (por ejemplo, anti-CD33), de manera similar a cómo se han adaptado los protocolos quimioterapéuticos a los pacientes con MLL-r con regímenes híbridos LMA/LLA (Britten et al., 2019).

Otro objetivo, como se mencionó anteriormente, puede ser el CD22, no obstante, la baja densidad de CD22, que es notoria en la leucemia MLL-r, podría hacer que las células CAR-T sean menos eficaces contra el objetivo. La modulación de la densidad de antígenos en las células tumorales para la regulación del CD22 utilizando bryostatina 1, podría aumentar las tasas de éxito. Se ha demostrado que el CAR-T multiobjetivo contra CD19 y CD22 simultáneamente puede lograr remisión (Britten et al., 2019).

Una opción CAR-T multiobjetivo alternativa específicamente para MLL-r es dirigirse a CD19 y CD133. CD133 es muy específico para células leucémicas MLL-r y particularmente



para el t (4;11). No obstante, requerirá más evaluaciones para establecer la viabilidad del CD133 como objetivo para minimizar los posibles efectos fuera del tumor (Britten et al., 2019).

Otro objetivo atractivo es el antígeno neuron-glial 2 (NG2), que es un marcador selectivo de leucemia MLL-r. También, el sulfato de condroitina proteoglicano 4 (CSPG4) es un potencial candidato para pacientes con MLL-r, con observaciones in vitro prometedoras (Britten et al., 2019).

## **Conclusiones**

La combinación de la terapia células CAR T con agentes inmunomoduladores, por ejemplo, inhibidores de puntos de control y citoquinas, o pequeños antagonistas moleculares que bloquean las vías bioquímicas cruciales para el crecimiento tumoral, constituye oportunidades que pueden tener efectos sinérgicos en el aumento de las respuestas antitumorales.

La tendencia que siguen las investigaciones actualmente está enfocada en la combinación de terapias. Por ejemplo, radiación con células CAR T, drogas epigenéticas con células CAR T o células CAR T con anticuerpos monoclonales (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

Se están investigando nuevos objetivos para la terapia con células T. Sin embargo, la aparición de resistencia a las terapias celulares debido a las redes inmunosupresoras intrínsecas sigue siendo una barrera importante para lograr la cura. La investigación adicional sobre los mecanismos de resistencia es crucial para desarrollar estrategias que maximicen la durabilidad de las respuestas al tiempo que se minimizan las toxicidades asociadas con las terapias celulares.

Las ventajas que tienen las células CAR T autólogas sobre las alogénicas es que se evita la EIVH y el rechazo agudo, pero la principal desventaja es el estado inmunológico en el que se encuentra el paciente que está en segunda recaída y por lo tanto la calidad deficiente de esos linfocitos T. Además, el tiempo que toma fabricar CAR T autólogas en condiciones ideales es de aproximadamente 3 semanas; en este tiempo, un paciente puede complicarse e

incluso fallecer. Mientras que los CAR T alogénicos pueden producir EIVH y rechazo agudo, aunque existen estrategias para disminuir este riesgo y el uso de esta terapia puede ser más rápida y oportuna (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

El mecanismo de resistencia a la terapia con células CAR-T en algunos pacientes es complicado; puede estar asociado con una expresión de antígeno diana disminuida o deficiente, la falta de persistencia de las células CAR-T, la carga tumoral, la densidad de los antígenos diana, el estado de las células CAR-T infundidas, las características de la enfermedad, así como el microambiente tumoral.

Además, la tecnología de células CAR T debe comercializarse a un costo aceptable. Los procesos piloto para su generación se desarrollaron originalmente en centros académicos para la investigación clínica de fase I temprana, que requieren un pequeño número de productos de células T. Estos procesos se basan en pasos manuales y no son adecuados para la fabricación comercial de miles de dosis terapéuticas necesarias para una futura terapia aprobada. El procesamiento industrializado de células T sólo puede lograrse con inversiones significativas en automatización y el establecimiento de un proceso totalmente cerrado. Una estrategia alternativa se basa en un modelo descentralizado en el que la fabricación de células CAR T se realice dentro de los centros de tratamiento.

Las mejoras en la modificación de genes, la selección de células T y las técnicas de expansión, así como el desarrollo de vectores virales y no virales seguros y más eficaces, mejorarán aún más la integración de las terapias génicas de células T.

Por último, para superar las limitaciones asociadas con la logística y la fabricación de la terapia de células T individualizadas en el entorno autólogo, se están realizando esfuerzos significativos para desarrollar fármacos de células T alogénicas universales y listos para usar.

Para iniciar este proceso en Costa Rica, se debe buscar la acreditación Joint Accreditation Committee of the ISCT and EBMT (JACIE) y capacitar a los profesionales de la salud involucrados, lo cual conlleva tiempo e inversión. Sin embargo, en cuanto a los costos, se debe considerar que un paciente con alguna de estas neoplasias genera un alto costo por morbilidad, complicaciones y hospitalizaciones, que podría disminuirse al utilizar una terapia

más dirigida como lo es el tratamiento con células CAR T (A. Montero, comunicación personal, 29 de mayo del 2021).

### Referencias bibliográficas

- Almåsbaek, H., Aarvak, T., & Vemuri, M. C. (2016, mayo 19). *CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment* [Review Article]. *Journal of Immunology Research*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2016/5474602>
- Britten, O., Ragusa, D., Tosi, S., & Mostafa Kamel, Y. (2019). MLL-Rearranged Acute Leukemia with t(4;11)(q21;q23)—Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy? *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111341>
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2019). Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood reviews*, 34, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.002>
- Bryan, W. W. (s. f.). *Tisagenlecleucel Novartis Pharmaceuticals Corporation*. 69.
- Células T con CAR: Manipulación de células inmunitarias para tratar el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer* (nciglobal,ncienterprise). (2013a, diciembre 6). [CgvArticle]. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/investigacion/celulas-t-y-car>
- Células T con CAR: Manipulación de células inmunitarias para tratar el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer* (nciglobal,ncienterprise). (2013b, diciembre 6). [CgvArticle]. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/investigacion/celulas-t-y-car>

- D'Aloia, M. M., Zizzari, I. G., Sacchetti, B., Pierelli, L., & Alimandi, M. (2018). CAR-T cells: The long and winding road to solid tumors. *Cell Death & Disease*, 9(3), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0278-6>
- Daniyan, A. F. O., & Brentjens, R. J. (2016). At the Bench: Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for the treatment of B cell malignancies. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(6), 1255-1264. <https://doi.org/10.1189/jlb.5BT1215-556RR>
- Enrique, I. B. (s. f.). *TÍTULO del TFG: REVISIÓN SISTEMÁTICA DE ENSAYOS CLÍNICOS CON TERAPIA CAR CONTRA LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA*. 39.
- Ghosh, A., Mailankody, S., Giralt, S. A., Landgren, C. O., Smith, E. L., & Brentjens, R. J. (2018). CAR T cell therapy for multiple myeloma: Where are we now and where are we headed? *Leukemia & Lymphoma*, 59(9), 2056-2067. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1393668>
- Goldsmith, S. R., Ghobadi, A., & DiPersio, J. F. (2020). Hematopoietic Cell Transplantation and CAR T-Cell Therapy: Complements or Competitors? *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.608916>
- Hirayama, A. V., Gauthier, J., Hay, K. A., Voutsinas, J. M., Wu, Q., Pender, B. S., Hawkins, R. M., Vakil, A., Steinmetz, R. N., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2019). High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Blood*, 134(7), 636-640. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000905>
- Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies | Journal of Hematology & Oncology | Full Text*. (s. f.). Recuperado 29 de noviembre de 2020, de <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-019-0746-1>

- John, L. B., Devaud, C., Duong, C. P. M., Yong, C. S., Beavis, P. A., Haynes, N. M., Chow, M. T., Smyth, M. J., Kershaw, M. H., & Darcy, P. K. (2013). Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(20), 5636-5646. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0458>
- Kim, M. Y., Yu, K.-R., Kenderian, S. S., Ruella, M., Chen, S., Shin, T.-H., Aljanahi, A. A., Schreeder, D., Klichinsky, M., Shestova, O., Kozlowski, M. S., Cummins, K. D., Shan, X., Shestov, M., Bagg, A., Morrissette, J. J. D., Sekhri, P., Lazzarotto, C. R., Calvo, K. R., ... Gill, S. (2018). Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Cell*, *173*(6), 1439-1453.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.013>
- Lin, Q., Zhao, J., Song, Y., & Liu, D. (2019). Recent updates on CAR T clinical trials for multiple myeloma. *Molecular Cancer*, *18*. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1092-1>
- Lowe, K. L., Mackall, C. L., Norry, E., Amado, R., Jakobsen, B. K., & Binder, G. (2018). Fludarabine and neurotoxicity in engineered T-cell therapy. *Gene Therapy*, *25*(3), 176-191. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0019-6>
- Mardiana, S., & Gill, S. (2020). CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00697>
- Marofi, F., Tahmasebi, S., Rahman, H. S., Kaigorodov, D., Markov, A., Yumashev, A. V., Shomali, N., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Mohammed, R. N., Jarahian, M., Motavalli, R., & Motavalli Khiavi, F. (2021). Any closer to successful therapy of

multiple myeloma? CAR-T cell is a good reason for optimism. *Stem Cell Research & Therapy*, 12. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02283-z>

Mirones, I., Moreno, L., Patiño-García, A., Lizeaga, G., Moraleda, J. M., Toribio, M. L., Pérez-Martínez, A., Mirones, I., Sisinni, L., García-Morín, M., Anguita, J., Ramírez, M., Díaz, M. Á., González, M., Moreno, L., Alonso, L., Rives, S., Alonso, M. M., Patiño-García, A., ... Pérez-Martínez, A. (2020). Immunoterapia con células CAR-T en hematooncología pediátrica. *Anales de Pediatría*, 93(1), 59.e1-59.e10. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.12.014>

Noonan, K. A., Huff, C. A., Davis, J., Lemas, M. V., Fiorino, S., Bitzan, J., Ferguson, A., Emerling, A., Luznik, L., Matsui, W., Powell, J., Fuchs, E., Rosner, G. L., Epstein, C., Rudraraju, L., Ambinder, R. F., Jones, R. J., Pardoll, D., & Borrello, I. (2015). Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. *Science Translational Medicine*, 7(288), 288ra78. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7014>

Pang, Y., Hou, X., Yang, C., Liu, Y., & Jiang, G. (2018). Advances on chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for oncotherapy. *Molecular Cancer*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0840-y>

Pérez-Rojo, B. (s. f.). *Leucemia mieloide aguda: Células T-CAR como tratamiento*. 3.

Pillai, V., Muralidharan, K., Meng, W., Bagashev, A., Oldridge, D. A., Rosenthal, J., Van Arnam, J., Melenhorst, J. J., Mohan, D., DiNofia, A. M., Luo, M., Cherian, S., Fromm, J. R., Wertheim, G., Thomas-Tikhonenko, A., Paessler, M., June, C. H., Luning Prak, E. T., Bhoj, V. G., ... Rheingold, S. R. (2019). CAR T-cell therapy is effective for CD19-dim B-lymphoblastic leukemia but is impacted by prior

- blinatumomab therapy. *Blood Advances*, 3(22), 3539-3549.  
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000692>
- Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y., & Grupp, S. A. (2018). Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0571-y>
- Ramos, C. A., Savoldo, B., Torrano, V., Ballard, B., Zhang, H., Dakhova, O., Liu, E., Carrum, G., Kamble, R. T., Gee, A. P., Mei, Z., Wu, M.-F., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Brenner, M. K., Heslop, H. E., & Dotti, G. (s. f.). Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated  $\kappa$  light chains. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2588-2596. <https://doi.org/10.1172/JCI86000>
- Rapoport, A. P., Stadtmauer, E. A., Binder-Scholl, G. K., Goloubeva, O., Vogl, D. T., Lacey, S. F., Badros, A. Z., Garfall, A., Weiss, B., Finklestein, J., Kulikovskaya, I., Sinha, S. K., Kronsberg, S., Gupta, M., Bond, S., Melchiori, L., Brewer, J. E., Bennett, A. D., Gerry, A. B., ... June, C. H. (2015). NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nature Medicine*, 21(8), 914-921. <https://doi.org/10.1038/nm.3910>
- Ruella, M., & Maus, M. V. (2016). Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.09.003>
- Sánchez, L. M. M., Hernández, L. F. Á., & Isaza, M. R. (2018). Células T CAR: Proeza que traspasa los avances en el tratamiento de las malignidades hematológicas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 34(4), Article 4. <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/923>

- Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, Ö., Brogdon, J. L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., Wasik, M., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Porter, D. L., & June, C. H. (2017). Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, 377(26), 2545-2554. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708566>
- Siddiqi, H. F., Staser, K. W., & Nambudiri, V. E. (2018). Research Techniques Made Simple: CAR T-Cell Therapy. *The Journal of Investigative Dermatology*, 138(12), 2501-2504.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.09.002>
- Townsend, M. H., Shrestha, G., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2018). The expansion of targetable biomarkers for CAR T cell therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0817-0>
- Turtle, C. J., Hanafi, L.-A., Berger, C., Hudecek, M., Pender, B., Robinson, E., Hawkins, R., Chaney, C., Cherian, S., Chen, X., Soma, L., Wood, B., Li, D., Heimfeld, S., Riddell, S. R., & Maloney, D. G. (2016). Immunotherapy of non-Hodgkin lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Science translational medicine*, 8(355), 355ra116. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8621>
- Wang, Z., Wu, Z., Liu, Y., & Han, W. (2017). New development in CAR-T cell therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0423-1>
- Zhou, J., Zhang, W., Zhang, Y., Zheng, S., Zhou, L., Yang, X., & Wang, C. (2020). Evaluation of the clinicopathologic features of diffuse large B cell lymphoma after CD19-targeted CAR T-cell therapy emphasizing the potential diagnostic pitfalls. *American Journal of Translational Research*, 12(10), 6751-6762.



