



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina



ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN DE CÉLULAS CAR-T PARA USO ALOGÉNICO: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Autor: Carlos Acebal Arranz

Tutora: Margarita González-Vallinas Garrachón

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Terapia CAR-T</i>	3
1.2 <i>Eficacia terapéutica de las células CAR-T</i>	5
1.3 <i>Limitaciones de las terapias CAR-T de uso autólogo y posibilidades del uso alogénico</i>	6
2. OBJETIVO	7
3. METODOLOGÍA	7
4. RESULTADOS	9
4.1 <i>MODIFICACIÓN GENÉTICA ADICIONAL</i>	9
4.1.1 Estrategias para permitir el uso alogénico de las CAR-T	9
4.1.2 Limitación de la mayoría de estrategias de modificación genética	11
4.1 <i>SELECCIÓN DE FUENTES CELULARES ESPECÍFICAS</i>	12
4.2.1 Linfocitos T $\gamma\delta$	12
4.2.2 Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)	14
4.2.3 Progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical	14
4.2.4 Subpoblaciones de linfocitos T memoria	15
4.2.5 Linfocitos T específicos de virus	15
4.2.6 Células asesinas inducidas por citocinas (CIK)	17
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	20
ANEXO I: SIGLAS	24
ANEXO II: REFERENCIAS NO CITADAS INCLUIDAS EN LA REVISIÓN	26

RESUMEN

Las células CAR-T son linfocitos T que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que permite reconocer antígenos tumorales. Hasta ahora las terapias aprobadas emplean linfocitos T propios del paciente (autólogos) y, aunque han obtenido muy buenos resultados, tienen limitaciones que pueden superarse empleando linfocitos de donantes sanos: elevados costes y tiempo de producción, dificultades de estandarización y disfunción de los linfocitos T autólogos. Esta revisión sistemática pretende agrupar y ordenar las distintas estrategias para evitar los dos grandes inconvenientes del uso alogénico de estas células: el rechazo y la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Las estrategias pueden dividirse principalmente en dos grandes grupos: las que incluyen modificaciones genéticas (adicionales a la integración del CAR) y las que se basan en la utilización de fuentes o subpoblaciones de linfocitos T alternativas. Dado el potencial de esta terapia, el creciente número de publicaciones sobre ella y su inminente incorporación a la práctica clínica, resulta fundamental una revisión exhaustiva de las distintas estrategias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Terapia CAR-T

La terapia con células CAR-T es uno de los tratamientos antitumorales más prometedores actualmente. Se basa en el uso de linfocitos T modificados genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), que dirige la actividad de los linfocitos T contra las células tumorales que expresan un determinado antígeno (1). Este receptor se compone de un dominio extracelular de unión a antígeno (generalmente el fragmento variable de cadena simple de un anticuerpo) unido por una región transmembrana a un dominio señalizador de activación del linfocito T (CD3 ζ). En una segunda generación de CAR se ha incorporado un segundo dominio intracelular coestimulador (CD28 o 4-1BB) y la tercera generación de CAR incorpora dos dominios coestimuladores (2).

Los linfocitos T se desarrollan a partir de precursores tímicos que, mediante reagrupamientos genéticos, generan clones con receptores de célula T (TCR) específicos, que posteriormente sufren la selección tímica positiva y negativa. Estos linfocitos T maduros vírgenes son tolerantes con los tejidos propios y circulan por la sangre hasta unirse a su antígeno, desencadenando esto su proliferación y diferenciación en células memoria o células efectoras. Esta activación requiere de la unión del TCR con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) unidas a péptidos en la superficie de las células presentadoras de antígeno, además de los

estímulos paralelos. Los estudios indican que la citotoxicidad y capacidad de proliferación de los linfocitos T es mayor para donantes sanos que para pacientes, existiendo importante variabilidad entre donantes sanos, relacionada con la proporción de células memoria (3).

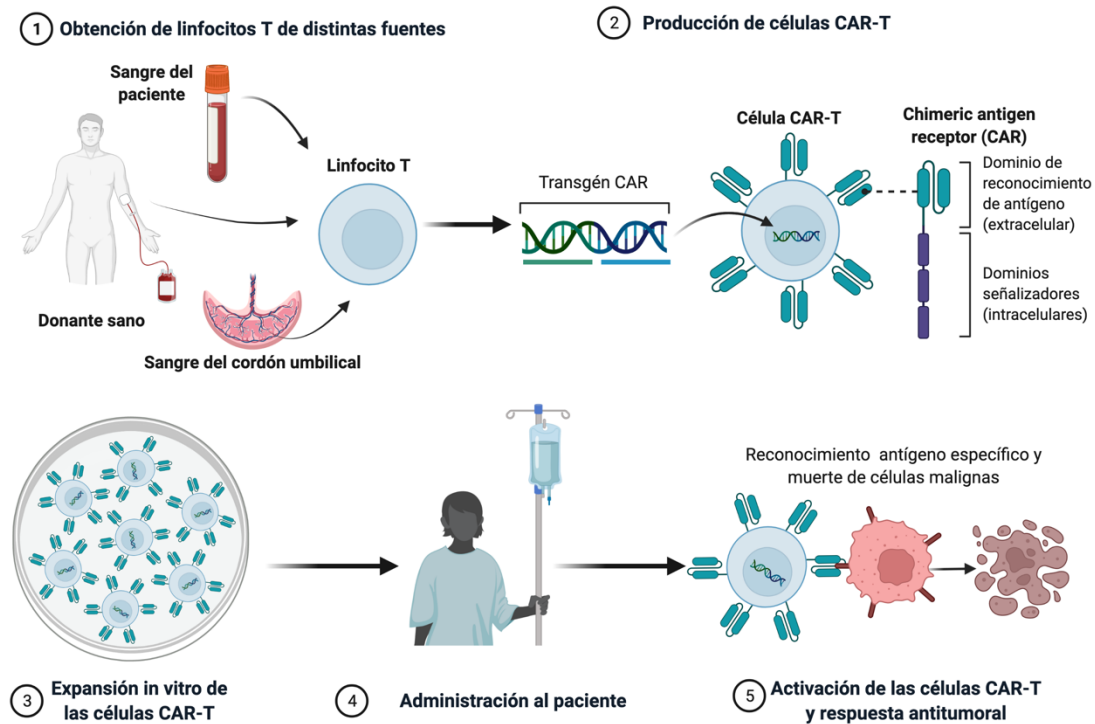


Figura 1: Proceso de producción de células CAR-T: 1. Extracción de linfocitos T (generalmente autólogos) y activación para cultivo *ex vivo* (generalmente a través de la estimulación de CD3 y CD28). 2. Modificación genética para expresión del CAR. 3. Expansión para obtener el número deseado. 4. Administración intravenosa al paciente. 5. Eliminación de las células tumorales.

Debido a que los linfocitos T de los pacientes con cáncer muchas veces resultan disfuncionales (4), se han desarrollado distintas estrategias de inmunoterapia con resultados muy prometedores, entre las cuales se encuentran las terapias CAR-T. Hasta el momento, todas las terapias aprobadas para su comercialización se utilizan para el tratamiento de neoplasias hematológicas, y la mayoría se dirigen específicamente contra el antígeno CD19.

La primera terapia CAR-T aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos fue tisagenlecleucel (Kymriah), de Novartis, en 2017 contra leucemia linfoblástica aguda (LLA) y al año siguiente contra linfoma B de células grandes. También en 2017 se aprobó axicabtagene ciloleucel (Yescarta), de Gilead, para linfoma B de células grandes y en 2021 para linfoma folicular. En 2020 se aprobó brexucabtagene autoleucel (Tecartus), de Gilead, para linfoma del manto, y en 2021

para LLA de precursores de linfocitos B. En 2021, lisocabtagene maraleucel (Breyanzi) para linfoma B de células grandes e idecabtagene vicleucel (Abecma) para mieloma múltiple, ambas de la compañía Bristol Myers Squibb. Este año (2022) se ha aprobado ciltacabtagene autoleucel (Carvykti), de Janssen Biotech (5). Además, en 2021 la AEMPS aprobó ARI-0001, un producto de fabricación no industrial desarrollado en el Hospital Clínic de Barcelona, que constituye el primer producto CAR-T aprobado desarrollado íntegramente en Europa (6).

La tecnología CAR permite dirigir la especificidad de los linfocitos T con otros fenotipos como los linfocitos Tregs, con función inmunorreguladora, para fomentar la tolerancia a aloinjertos de piel (7), páncreas (8,9) y para tratar la EICH (10).

Con respecto a los antígenos de las terapias CAR-T antitumorales aprobadas, idecabtagene vicleucel y ciltacabtagene autoleucel se dirigen contra el antígeno BCMA, mientras que las demás terapias CAR-T aprobadas se dirigen contra CD19. Por otra parte, todas se fabrican a partir de los linfocitos T del propio paciente (uso autólogo), por lo que cada producto obtenido se destina a un tipo tumoral y un paciente específicos.

Las mayores complicaciones de las terapias CAR-T son la tormenta de citocinas, en inglés *cytokine release syndrome* (CRS), caracterizada por una respuesta inmunitaria exacerbada, y la neurotoxicidad asociada a células inmunes, *immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome* (ICANS), que es un síndrome con afectación del sistema nervioso central que tiene la peculiaridad de no tener una única localización (11). Con el tiempo se va adquiriendo más experiencia en el manejo de estas complicaciones y se han elaborado protocolos, que varían entre centros, para ello. Además, los tratamientos con células CAR-T deben administrarse en centros con un personal bien entrenado y con experiencia en el campo para reconocer y tratar precoz y adecuadamente las complicaciones.

1.2 Eficacia terapéutica de las células CAR-T

La LLA es una enfermedad con muy mal pronóstico en adultos, con una mediana de supervivencia de 6 meses y, aunque la mayoría de pacientes pediátricos se consiguen curar con quimioterapia, entre un 15 y un 20% recaen. De éstos, aproximadamente la mitad sufren una segunda recidiva. Por su parte, el linfoma B difuso de células grandes también tiene un pronóstico infausto. En cuanto al linfoma del manto, se ha avanzado mucho con la aparición de los inhibidores de la tirosín-kinasa de Bruton. El mieloma múltiple continúa siendo, hasta ahora, una enfermedad incurable. El tiempo de supervivencia libre de enfermedad varía mucho dependiendo de diversos factores, como el tratamiento administrado o si ha recibido trasplante autólogo de progenitores

hematopoyéticos, pero la norma es que la enfermedad acaba recidivando. Según un metaanálisis que pretendía evaluar la eficacia de las terapias CAR-T axicabtagene ciloleucel, tisagenlecleucel y lisocabtagene maraleucel en diferentes cánceres hematológicos, la tasa de respuestas completas es superior al 50% y la tasa de respuestas completas y/o parciales, superior al 70% (12).

La terapia CAR-T, por lo tanto, ha experimentado un auge en los últimos años, presentándose como última opción para un no desdeñable grupo de pacientes con enfermedad refractaria o recidivante, que agotan los tratamientos disponibles, demostrando una alta eficacia en estos. Ante tales resultados ha crecido exponencialmente el número de estudios preclínicos y clínicos en este campo, se han incluido los productos aprobados en los esquemas de tratamiento y la expectativa es que escalen posiciones en ellos y continúen apareciendo nuevas terapias.

1.3 Limitaciones de las terapias CAR-T de uso autólogo y posibilidades del uso alogénico

Las terapias autólogas no producen rechazo y pueden, por tanto, persistir *in vivo* largos periodos de tiempo. A pesar de su eficacia terapéutica, la necesidad de producir estas terapias de forma individualizada es uno de sus principales inconvenientes, ya que conlleva unos costes y tiempo de fabricación muy elevados. Estos tratamientos requieren entre 3 y 6 semanas desde la aféresis hasta la posterior infusión, y en este tiempo puede cambiar el estado funcional del paciente, así como su enfermedad. Además, los linfocitos T de los pacientes con cáncer son frecuentemente disfuncionales debido a los tratamientos y/o a la propia enfermedad, lo que a veces imposibilita la fabricación de la terapia CAR-T.

Las terapias alogénicas tienen el potencial de solventar estas limitaciones: se obtendrían células a partir de donantes sanos, pudiendo estandarizar el tratamiento, su producción sería más barata gracias a un proceso industrial y estarían criopreservadas y siempre disponibles con posibilidad de administrar repetidas dosis (Tabla 1). Para conseguirlo se deben resolver dos grandes problemas potenciales derivados del uso alogénico de los linfocitos T: la enfermedad injerto contra huésped (EICH), que puede llegar a ser muy grave, y el rechazo del injerto por parte del sistema inmune del receptor, que puede limitar la eficacia de la terapia (2).

La rapidez de los avances en el desarrollo de las terapias CAR-T durante los últimos años y el prometedor potencial de las células CAR-T de uso alogénico, plantea la necesidad de una revisión exhaustiva de las diferentes estrategias de producción de

este tipo de terapias destinadas a evitar la aparición de los problemas previamente mencionados.

Tabla 1: Terapia CAR-T autóloga y alogénica: ventajas y desventajas.

(EICH: Enfermedad injerto-contra-huésped).

	CAR-T AUTÓLOGAS	CAR-T ALOGÉNICAS	
VENTAJAS	No generan rechazo.	Persistencia <i>in vivo</i> limitada: requieren modificaciones adicionales o inmunosupresión.	DESVENTAJAS
	No producen EICH.	Potencial EICH.	
DESVENTAJAS	Alto coste y tiempo de fabricación.	Fabricación industrial y posibilidad de criopreservar los productos.	VENTAJAS
	Eficacia dependiente del donante.	El producto puede estandarizarse.	
	La viabilidad de los linfocitos T suele estar disminuida por tratamientos y por la propia enfermedad.	Linfocitos T con calidad óptima por obtenerse de pacientes sanos.	

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo consiste en realizar una revisión sistemática de las estrategias que se están desarrollando para la producción de terapias antitumorales basadas en células CAR-T de uso alogénico, es decir, que se fabriquen a partir de células de un donante para su uso potencial en uno o varios pacientes.

La relevancia de la revisión reside en la escasez de publicaciones centradas en este tema, así como en la dificultad de agrupar y ordenar las distintas estrategias, la mayoría de ellas publicadas muy recientemente, que incluyen desde la ingeniería genética hasta la selección de subpoblaciones de linfocitos T muy concretas pasando por el uso de células iPSC.

3. METODOLOGÍA

Se realiza una búsqueda en *PubMed* con el objetivo de identificar todas las publicaciones que describan estrategias de producción de terapias CAR-T alogénicas con los términos más frecuentemente utilizados: “CAR” o “*chimeric antigen receptor*”, “*T cell*” y “*allogeneic*”, “*donor-derived*”, “*virus-specific*” o “*off-the-shelf*”. Se excluyen revisiones y metaanálisis. Se modifica la búsqueda mediante operadores booleanos para evitar que aparezcan trabajos centrados en trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y en terapias CAR-NK y CAR-macrófago.

La combinación de términos utilizada finalmente es la siguiente y devuelve 152 resultados: “(chimeric antigen receptor[Title/Abstract] OR car[Title/Abstract]) AND (t cell[Title/Abstract]) AND (allogeneic[Title/Abstract] OR donor derived[Title/Abstract] OR off the shelf[Title/Abstract] OR virus specific[Title/Abstract]) NOT (review[Publication Type]) NOT (systematic review[Publication Type]) NOT (meta-analysis[Publication Type]) NOT (cell, nk[MeSH Terms]) NOT (hematopoietic stem cell transplantation[MeSH Terms]) NOT (stem cell transplant[Title/Abstract]) NOT (stem cell transplantation[Title/Abstract]) NOT (car nk[Title/Abstract]) NOT (chimeric antigen receptor nk[Title/Abstract]) NOT (CAR-macrophage cells[Title/Abstract])”.

Para tratar de identificar otras estrategias que no se hayan publicado en revistas científicas se lleva a cabo una búsqueda de patentes en Espacenet (<https://worldwide.espacenet.com/patent/>). Se introduce la siguiente combinación de términos “((ta = "virus-specific" OR ta = "allogeneic" OR ta = "donor-derived" OR ta = "off-the-shelf") AND (ta = "chimeric antigen receptor" OR ta = "car") AND ta any "t cell") NOT (ta = "transplant*" OR ta = "hsct")” que arroja 48 resultados.

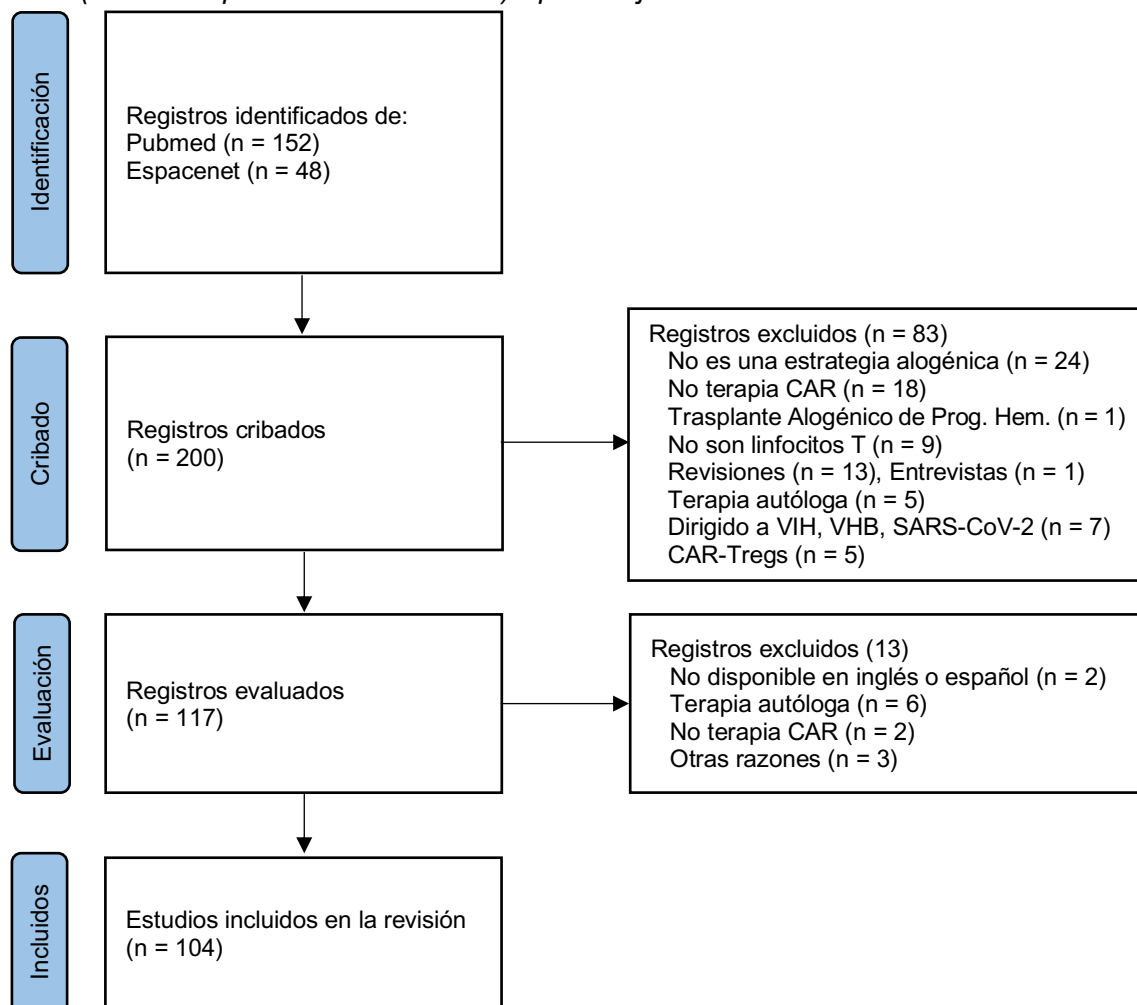


Figura 1: Diagrama de flujo que resume el proceso de selección de estudios incluidos en la revisión sistemática.

Para el cribado de los trabajos obtenidos en *PubMed* se importaron a *Rayyan* (<https://rayyan.qcri.org/>) y se excluyeron aquellas publicaciones que: (i) comparan trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) con otras terapias, (ii) se centran en terapias autólogas, (iii) no se centran en estrategias de producción de células CAR-T alogénicas o (iv) son revisiones. También se descartan trabajos dedicados al tratamiento antiviral de VHB y VIH.

4. RESULTADOS

Mediante la búsqueda descrita anteriormente encontramos diferentes estrategias de producción de células CAR-T alogénicas, que principalmente pueden dividirse en dos grandes grupos: las que incluyen modificaciones genéticas (adicionales a la integración del CAR) y las que se basan en la utilización de fuentes o subpoblaciones de linfocitos T alternativas específicas.

4.1 MODIFICACIÓN GENÉTICA ADICIONAL

Por definición, todas las células CAR-T, tanto autólogas como alogénicas, son linfocitos T modificados genéticamente para expresar un receptor CAR específico en su membrana. Para permitir su uso alogénico, varias estrategias de producción incluyen la realización de modificaciones genéticas adicionales a la inclusión del CAR.

4.1.1 Estrategias para permitir el uso alogénico de las CAR-T

Para evitar la alorreactividad, uno de los objetivos más importantes en la producción de células CAR-T alogénicas, se puede cambiar la especificidad del TCR o eliminarlo completamente, dado que este complejo es el principal causante de la alorreactividad y puede ocasionar EICH. La eliminación resulta más simple, ya que se realiza noqueando genes de las cadenas α o β del TCR, mientras que la alteración de la especificidad de este receptor requiere la interrupción secuencial y el reemplazo de los genes de ambas cadenas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la interrupción de un solo gen del complejo TCR sin reemplazo se acompaña de la pérdida de expresión de su subunidad CD3 en la superficie celular. Esto puede disminuir la supervivencia y proliferación celular *ex vivo* ya que, en la producción de las células CAR-T, frecuentemente se emplea estimulación de CD3 y CD28 para su activación.

El uso de CRISPR/Cas9 para la edición génica ha experimentado un gran auge durante los últimos años y en el campo de la terapia CAR-T alogénica presenta ventajas para ediciones múltiples frente a otro tipo de nucleasas. Con la modificación de distintos genes se busca obtener características ventajosas para las células CAR-T. Para producir este tipo de células, habitualmente se incorporan por electroporación el mRNA

que codifica Cas9 o la proteína misma, junto con los RNA guía (gRNA), dirigidos frente a los genes a noquear. La endonucleasa crea una rotura del DNA que se repara por unión de extremos no homólogos (NHEJ) con desplazamiento del marco de lectura. La mínima presencia de mutaciones fuera de diana apoya la hipótesis de que CRISPR/Cas9 es más precisa en linfocitos T que en otro tipo de células. Además, el uso de eSpCas9, una variante de alta fidelidad de Cas9, minimiza este efecto indeseable (13).

Además de la eliminación o modificación del TCR, otra edición genética habitualmente utilizada en el desarrollo de células CAR-T alogénicas es el noqueo del gen *B2M*, que impide la expresión de las moléculas HLA-I, responsables principales del rechazo del injerto, pues pueden ser reconocidas como extrañas por los linfocitos T del receptor. Un ejemplo es el trabajo de Ren *et al.*, que dirigen los gRNA frente a las regiones constantes de las cadenas α y β del TCR. El cocultivo de los linfocitos TCR⁻/HLA-I⁻ con células alogénicas mononucleares (PBMC) irradiadas desencadena una mínima respuesta, probablemente mediada por linfocitos NK de la población de PBMC. Este mismo grupo (14) y otros (15) han introducido los gRNA en el vector lentiviral junto al transgén del CAR para conseguir una expresión constitutiva y una vida media más larga de éstos, con el objetivo de aumentar la eficiencia y obtener una población más homogénea.

Los linfocitos T activados aumentan la expresión de moléculas HLA-II, cuya incompatibilidad injerto-huésped puede activar linfocitos CD4. Por eso se ha propuesto noquear además el gen *CIITA*, un importante factor de transcripción de HLA-II, para impedir la expresión de estas moléculas, produciendo células triple negativas (TCR⁻/HLA-I⁻/HLA-II⁻) (16) o noquear los genes *HLA-DRA*, *-DQA* y *-DPA*, que codifican las cadenas α , menos polimórficas que las β , obteniendo una mayor eficiencia (17).

La inhibición de los puntos de control inmunitarios mediante anticuerpos monoclonales es una estrategia muy extendida en el campo de la oncología, dados sus buenos resultados en muchos tumores. Por eso el silenciamiento de genes que forman parte de este eje de señalización, como PD1 (*programmed cell death 1*) y CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), que son receptores inhibidores implicados en el agotamiento de las células efectoras y el escape inmune de las células tumorales, se están estudiando con el objetivo de aumentar la actividad citolítica (4,13,14,18).

Dado que la edición múltiple con nucleasa Cas9 puede generar roturas de doble cadena, con riesgo de reordenamientos genéticos e inestabilidad cromosómica, se ha propuesto la utilización de proteínas editoras de base, como las denominadas BE3 y BE4 (sustituyen C por T), dirigidas a alterar los sitios de *splicing* o a crear codones de terminación prematuros, que no ocasionan roturas dobles y minimizan este riesgo (19).

Una estrategia que combina la eliminación del TCR con la integración del transgén del CAR consiste en utilizar un virus adenoasociado (AAV) para introducir el CAR de forma dirigida en el locus del gen *TRAC* (que codifica para la región constante de la cadena α del TCR) mediante estrategias basadas en distintas nucleasas como megaTAL (20) u otras modificadas (21), que realizan el corte en el gen mencionado, impidiendo la expresión del TCR. Yang *et al.* realizan la misma estrategia de integración dirigida del transgén del CAR en el locus del *TRAC* utilizando ADN desnudo de doble cadena en lugar de vectores virales (22).

Varios grupos han desarrollado células CAR-T con modificaciones adicionales como TCR⁻/CD52⁻ (23) o TCR⁻/dCK⁻ (24), editadas mediante TALEN, que además de no causar EICH son resistentes a otros tratamientos concomitantes habituales como la inmunodepleción con alemtuzumab o con análogos de purinas, respectivamente.

Para aumentar la seguridad de estas terapias se pueden insertar interruptores de suicidio, como la caspasa 9 inducible (25), que produce la apoptosis al administrar una molécula pequeña (*small molecule*), o dominios de unión a rituximab (3,26–28), que permiten eliminar las células CAR-T administrando este anticuerpo monoclonal.

En el tratamiento de leucemias o linfomas de estirpe T la terapia alogénica tiene ventajas adicionales, ya que evita tener que separar linfocitos T autólogos de células malignas, algo muy costoso y técnicamente complejo. Por otra parte, la expresión común de antígenos entre células efectoras y tumorales conlleva la eliminación de las células CART entre ellas, el llamado fratricidio. Una estrategia alogénica que minimiza este fratricidio consiste en generar células CAR-T TCR/CD7⁻ dirigidas contra CD7 (29). GC027, un producto patentado como TruUCAR, comparte estas características y se está probando en un ensayo en fase I con resultados preliminares prometedores (30,31).

4.1.2 Limitación de la mayoría de estrategias de modificación genética

La eliminación de la expresión del complejo TCR en membrana, que es una constante en la mayoría de las estrategias para producción de células CAR-T alogénicas basadas en modificaciones genéticas adicionales, implica también la pérdida de expresión de las subunidades CD3, que forman parte de dicho complejo. Esto supone una menor capacidad de expansión *ex vivo*, al ser este el estímulo habitual utilizado para la activación de los linfocitos T en cultivo. R. Galetto *et al.* (32) demuestran en células de la línea Jurkat y en linfocitos T modificados para eliminar la expresión de la subunidad TCR α , que la expresión de pre-TCR α , un sustituto endógeno de la cadena α del TCR que participa en la maduración de los linfocitos T, aumenta la expresión en membrana

de CD3 y que la estimulación de esta vía con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (la activación de linfocitos T habitualmente utilizada *in vitro*) es capaz de transducir señales de activación e inducir, por tanto, la proliferación celular. Para ello, insertan el gen que codifica para una forma de pre-TCR α truncada en el *locus TRAC*, por reparación no homóloga mediante TALEN. El pre-TCR α es capaz de formar puentes disulfuro con las cadenas β del TCR y formar complejos con CD3 en la membrana, formando el denominado pre-TCR. Así, las células CAR-T alogénicas obtenidas pueden estimularse *ex vivo* mediante los métodos habituales.

El grupo de Michaux *et al.* ha desarrollado una alternativa a la interrupción del TCR introduciendo junto al CAR el gen que codifica para un péptido CD3 truncado que compite con el CD3 endógeno para la formación del complejo TCR, inhibiendo la expresión de éste en la membrana celular y con ello la capacidad de producir EICH (33). Otro método para silenciar el TCR sin noquear ninguna de sus subunidades consiste en expresar una proteína que se une a CD3 ϵ reteniéndolo en el citoplasma e impidiendo la formación del complejo TCR-CD3 (34).

Un grupo ha demostrado que la expresión de K3 y K5, proteínas ubiquitín-ligasa del virus herpes 8 que son capaces de degradar las moléculas HLA-I y HLA-II, MICA y MICB, respectivamente, disminuye el rechazo de las células CAR-T (35).

4.1 SELECCIÓN DE FUENTES CELULARES ESPECÍFICAS

El uso de linfocitos T procedentes de un donante compatible es una estrategia técnicamente sencilla pero sujeta a la disponibilidad de éste y con desventajas propias de las terapias autólogas, como el alto coste, la falta de estandarización y el tiempo de fabricación. No es una terapia verdaderamente *off-the-shelf*, pero se ha usado experimentalmente en algunos casos (25,36). A continuación, se describen distintas estrategias de producción de células CAR-T alogénicas basadas en la obtención de células de donante, generalmente seleccionando una subpoblación específica que permitiría el uso alogénico sin ocasionar EICH.

4.2.1 Linfocitos T $\gamma\delta$

Las células T $\gamma\delta$ constituyen solo entre el 1 y el 5 % de los linfocitos circulantes, pero son predominantes en algunos órganos epiteliales, como el intestino, los órganos reproductores, la lengua y la piel (2). Están implicadas en la vigilancia y la inmunidad antitumoral y su infiltración en el tumor correlaciona altamente con la supervivencia. Forman parte de la inmunidad innata y presentan una inherente capacidad citotóxica contra las células tumorales. Las células T $\gamma\delta$ se pueden dividir en dos subconjuntos principales en función de su cadena δ : las células V δ 2⁺ suelen coexpresar la cadena

V γ 9, mientras que las células V δ 2⁻ se pueden emparejar con una serie de cadenas V γ . Las células del subtipo V γ 9V δ 2 T son predominantes en la sangre periférica circulante y, además, pueden actuar como células presentadoras de antígenos (APC) después de la activación, lo que puede desempeñar un papel fundamental en la mejora de la respuesta inmunitaria (37). Por su parte, las células V δ 1⁺ predominan en tejidos periféricos, y en sangre periférica representan tan solo entre el 12 y el 22% del total de células T $\gamma\delta$ o el 0,2 % de las células mononucleares (38).

La razón por la cual las células T $\gamma\delta$ no producen EICH radica en el reconocimiento diferente de antígenos por parte de los receptores TCR $\gamma\delta$ y TCR $\alpha\beta$, pues los TCR $\gamma\delta$ reconocen antígenos nativos no procesados, muchos de los cuales son inducidos o regulados al alza después de una lesión, infección o transformación celular, mientras que los TCR $\alpha\beta$ reconocen antígenos peptídicos procesados unidos a moléculas HLA. Esta subpoblación T $\gamma\delta$ también expresa receptores propios de células NK, por lo que reconocen marcadores de estrés y daño celular (38). Además, penetran mejor en tejidos no inflamados que las células T $\alpha\beta$.

La expansión de las células T $\gamma\delta$ *in vitro* está por perfeccionar. En un trabajo que estudia la variabilidad de la expansión entre donantes se ha relacionado el éxito de la expansión con la práctica de ejercicio y la actividad física previa a la extracción (39). El proceso consiste en expandir PBMC en presencia de zolendronato y posteriormente deplecionar las células TCR $\alpha\beta$ ⁺ (40). En un estudio, las células T V γ 9V δ 2 expresando un CAR-MUC1 resultaron más efectivas que las T $\alpha\beta$ con el mismo CAR, aunque su persistencia *in vivo* fue menor (37).

La subpoblación V δ 1 se asocia a ciertos beneficios como un fenotipo virgen de memoria, tropismo por los tejidos y resistencia a la muerte celular inducida por activación. Sin embargo, su expansión es más difícil. Un grupo lo ha conseguido utilizando células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC), irradiadas y modificadas para expresar CD86/41BBL/CD40L y el antígeno de citomegalovirus pp65, como “células alimentadoras” para la expansión de la subpoblación memoria V δ 1. Estas expresan además un gen suicida para eliminarlas del producto final (41). Otra estrategia para expandir específicamente las células V δ 1⁺ se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal frente a esta cadena del TCR (42). Un producto V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T que usa también un anticuerpo monoclonal para la activación ha tenido muy buenos resultados en modelos de linfoma B, por lo que se está probando en fase clínica ([NCT04735471](#)) (38).

Los linfocitos T $\gamma\delta$ se han utilizado también para, mediante la transducción de un CAR no señalizador (NSCAR), que carece de dominio de activación, dirigirlos hacia las células diana, para que actúen mediante su inherente actividad citotóxica antitumoral.

Se han probado contra neoplasias de linfocitos B o T, introduciendo un CAR dirigido contra antígenos propios de dichas poblaciones linfocitarias (CD19 y CD5, respectivamente) (43).

4.2.2 Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Teóricamente, una línea iPSC maestra tiene una capacidad ilimitada para autorrenovarse y diferenciarse a cualquier tipo celular y, por tanto, para ser la fuente celular de la terapia CAR alogénica. Podría generarse un banco de líneas iPSC con diferentes combinaciones de haplotipos HLA, de manera que se pueda seleccionar el más compatible con el paciente para minimizar el riesgo de EICH y de rechazo de las células iPSC CAR-T o, por el contrario, usar la edición genética para eliminar los complejos TCR y/o HLA, como se ha indicado anteriormente (2).

Las iPSC se desarrollan a partir de diferentes tipos celulares (fibroblastos, linfocitos, etc.) que son reprogramadas hasta una célula menos diferenciada introduciendo moléculas y/o genes específicos. Un ejemplo es el de Wang *et al.*, que generan las células iPSC a partir de linfocitos vírgenes o de memoria (CD62L⁺). En los clones seleccionados se transduce el CAR y se expanden las células que lo expresan. Entonces se diferencian hacia linfocitos T en tres pasos: primero a células del mesodermo, después a células hematopoyéticas y por último a célula T (44). Una ventaja de usar iPSC es que las células CAR-T se generan a partir de una línea celular pluripotente con capacidad de expansión clonal y, por lo tanto, las modificaciones genéticas a las que se sometan son homogéneas en la población final (2). Esto sucede si se introduce el CAR en el locus del gen *TRAC*, inhibiendo así la expresión del TCR (45). Otros grupos generan las células iPSC a partir de linfocitos T con una especificidad determinada para que este se exprese y reconozca las células tumorales tanto a través del CAR como del TCR (46).

Para resolver el problema del rechazo, un grupo ha producido células CAR-T procedentes de iPSC que carecen de β 2-microglobulina, del transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y del receptor del poliovirus o CD155 (ligando del receptor inhibitor DNAM-1, propio de células NK), y que expresan el antígeno E de MHC clase I de una sola cadena, ligando del receptor inhibitor NKG2A (47). De esta manera evitan el rechazo también por parte de las células NK debido al hecho de no expresar moléculas MHC.

4.2.3 Progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical

Los progenitores hematopoyéticos del cordón umbilical poseen gran capacidad de proliferación, inducen la tolerancia inmunológica y la incidencia de EICH severa es

mucho más baja de lo que se podría esperar en base al grado de incompatibilidad HLA donante-receptor, por lo que son una interesante fuente celular para la terapia CAR-T (48).

Se pueden extraer células CD3⁺ del cordón umbilical e insertar el transgén CAR (49,50), aunque para minimizar aún más el riesgo de EICH podrían noquearse *TRAC*, *B2M* e inducir la expresión de HLA-E, que inhibe el rechazo por parte de las células NK (51). Estos linfocitos tienen fenotipo *naïve* y no expresan CD25, a diferencia de los linfocitos de sangre periférica, lo que permite en las primeras descartar células Treg (CD25⁺)(51). Por otra parte, en un estudio los autores diferencian los progenitores hematopoyéticos a linfocitos T $\gamma\delta$ (52), lo que conllevaría además las ventajas descritas anteriormente, y en una patente, además, se silencia el gen *B2M* mediante CRISPR (53).

4.2.4 Subpoblaciones de linfocitos T memoria

Se considera que la mayoría de las células con fenotipo memoria tendrán una especificidad dirigida a antígenos detectados previamente, que se prevé que sean diferentes a los del paciente receptor de la terapia CAR-T. Mediante la depleción de las células CD45RA⁺, Fernández *et al.* obtienen una población purificada de linfocitos T memoria central y memoria efectora, usando partículas magnéticas, cuya infusión ha demostrado ser segura en modelos animales. Entre los motivos por los que las células memoria son menos alorreactivas se encuentran que migran menos a órganos que manifiestan EICH, como el tracto intestinal, y que la mayoría de células memoria tienen especificidad por antígenos exógenos, frente a los que han reaccionado previamente (54). En un paso adicional de purificación se pueden descartar monocitos, que expresan CD14. Esta población es reactiva frente a antígenos virales, lo que puede además conferir protección a los pacientes frente a estos patógenos. Este tipo de terapia con células CAR-T CD45RA⁻/CD14⁻ ha recibido autorización de la FDA para ensayos en humanos (55). La subpoblación de linfocitos T de memoria central (CD45RA⁻/CD62L⁺) tiene una persistencia *in vivo* aumentada, por lo que algunos autores, como Wang *et al.* (56), seleccionan específicamente esta subpoblación.

4.2.5 Linfocitos T específicos de virus

Los linfocitos T específicos de virus tienen un TCR que reconoce antígenos virales, entre otros de virus varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), adenovirus (Adv) y citomegalovirus (CMV). La infusión de linfocitos específicos de virus se ha empleado en pacientes oncohematológicos que han recibido trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, tras el cual sufren habitualmente infecciones virales o trastornos linfoproliferativos asociados a virus de Epstein-Barr. Dada la especificidad de su TCR

no son alorreactivos, por lo que podrían usarse como fuente celular para productos CAR-T alogénicos; sin embargo, pueden ser rechazados por el huésped. Para superar esta limitación, se ha planteado crear un banco de donantes para administrar células HLA compatibles.

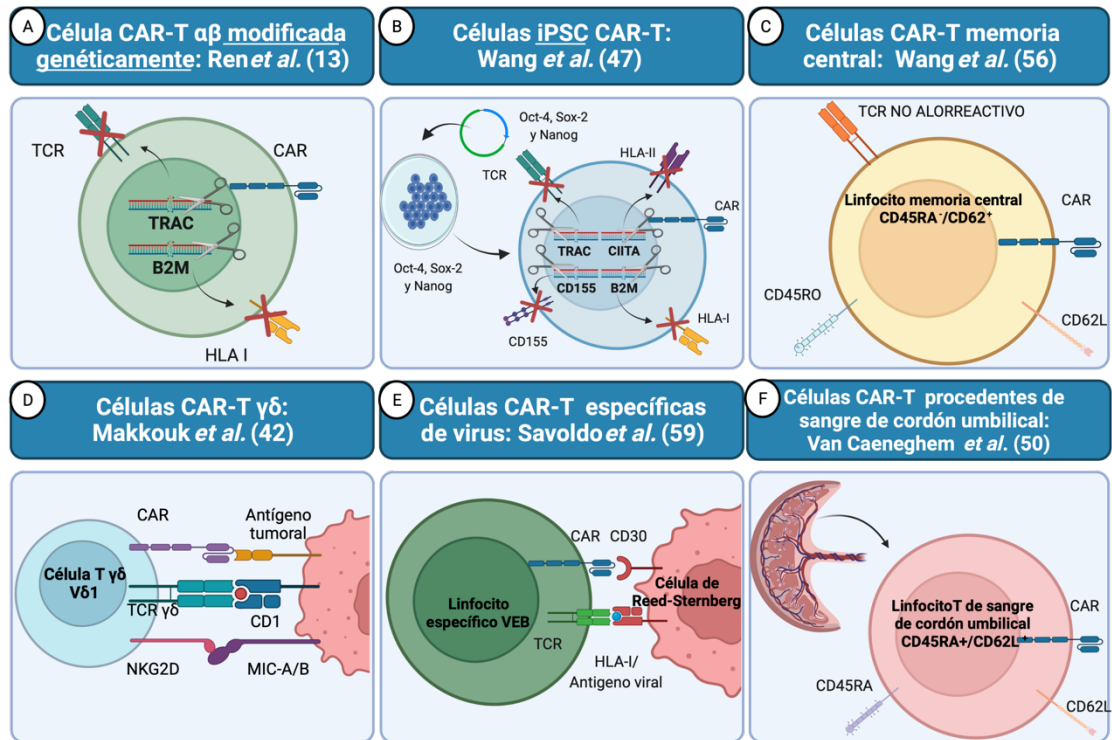


Figura 3: Ejemplos representativos de estrategias para producir células CAR-T alogénicas: (A) con modificaciones genéticas adicionales, (B) derivadas de células iPSC, (C) derivadas de células memoria central, (D) derivadas de linfocitos T $\gamma\delta$, (E) específicas de virus y (F) procedentes de sangre de cordón umbilical.

Para obtener estas subpoblaciones de linfocitos T específicos de virus, se exponen PBMC a células presentadoras de antígeno de distintos tipos (57) o determinadas líneas celulares, con la peculiaridad de que expresan antígenos virales, como células linfoblastoides transformadas por VEB (58,59). Nakazawa *et al.* dirigen linfocitos T específicos de virus de Epstein-Bar (VEB) contra HER-2 mediante un CAR específico. Para ello se estimulan las células supervivientes a la nucleofección del CAR con células linfoblastoides transformadas por VEB en medio suplementado con IL-4, IL-7 y IL-15 en distintas fases (58).

Además, el potenciamiento de las células CAR-T específicas de virus mediante vacunas o inyección de virus oncolíticos podría poner solución a la escasa expansión que experimentan las células inmunes en el microambiente inmunosupresor de los tumores sólidos. Otra estrategia para potenciar la expansión *in vivo* de células CAR-T específicas de VEB es insertar también un receptor de IL-7, que no se expresa en linfocitos Treg,

de manera que la administración de IL-7 activaría específicamente las células CAR-T y no las Treg (60).

Se pueden usar linfocitos específicos de VEB dotados de un Co-CAR CD19, que carece de dominio estimulador CD3, de manera que aporta únicamente la señal coestimuladora a la activación mediante TCR, la cual dependería de la detección del antígeno viral (61).

Tabla 2: Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de terapia CAR-T para uso alogénico.

ESTRATEGIA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
CAR-T TCR⁺/HLA⁻	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No inmunogénicas. ▪ Alta disponibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja proliferación. ▪ Coste.
iPSC CAR-T	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fuente ilimitada. ▪ Producto homogéneo (especificidad del TCR). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Técnicamente complejo y costoso. ▪ Riesgos potenciales.
γδ CART	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reconocen antígenos independientemente de HLA y poseen receptores NK. ▪ Eficacia en tumores sólidos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Persistencia <i>in vivo</i> corta. ▪ Baja disponibilidad.
CAR-T procedentes de sangre de cordón umbilical	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja alorreactividad. ▪ Poco rechazo. ▪ Capacidad de proliferación 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja disponibilidad. ▪ Problemas éticos.
CAR-T específicas de virus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protección adicional frente a infecciones virales. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Persistencia <i>in vivo</i> corta.
CAR-T CD45RA⁻ (memoria temprana)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fácil obtención. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Persistencia <i>in vivo</i> corta.
CAR-T CIK	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fenotipo de alta citotoxicidad (<i>NK-like</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Persistencia <i>in vivo</i> corta.

4.2.6 Células asesinas inducidas por citocinas (CIK)

Este tipo celular, obtenido por cultivo *ex vivo* de PBMC con citocinas específicas (habitualmente IFN-γ y IL-2) y anticuerpos monoclonales anti-CD3, también se ha utilizado para producir células CAR-T con potencial uso alogénico. Un grupo de investigación empleó el transposón SB para transducir el CAR en CIK tras su exposición a células mononucleares irradiadas provenientes de la misma fuente (62). El uso de

células asesinas inducidas por citocinas [del inglés, *cytokine-induced killer cells* (CIKs)] presenta la ventaja de una citotoxicidad no restringida por HLA y una mínima alorreactividad. Esta población expresa marcadores de linfocitos T con gran proporción de células T *NK-like* (CD3⁺CD56⁺).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta revisión sistemática se ha tratado de recopilar, mediante una búsqueda sistemática, todas las estrategias de producción de células CAR-T provenientes de fuentes alogénicas que no produzcan EICH y que no sean rechazadas por el receptor. Este trabajo se ha realizado acorde a la guía PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*) (63). Una posible fuente de sesgos es que la revisión ha sido realizada por un solo revisor.

La terapia CAR-T es un tratamiento antitumoral prometedor, que se consolida a medida que se proponen soluciones a sus desventajas y limitaciones y se adquiere experiencia clínica, como demuestra el creciente número de publicaciones y de tratamientos aprobados por las agencias reguladoras.

Hasta ahora todas las terapias aprobadas para su comercialización son autólogas, así como las utilizadas en la mayoría de ensayos clínicos realizados. Dadas las ventajas de ambas, con alta probabilidad convivirán en el futuro. Los tratamientos autólogos usan células del paciente por lo que, a priori, son más seguros y eficaces al no ser inmunogénicos y persistir *in vivo* a más largo plazo, aunque dependen de la calidad de las células del propio paciente, requieren un tiempo de fabricación desde la aféresis hasta la infusión que puede ser crítico para el paciente, y no son susceptibles de una fabricación a gran escala ni de estandarización.

Por el contrario, los tratamientos alogénicos sí son potencialmente alorreactivos e inmunogénicos, es decir, pueden producir EICH y su eficacia se ve condicionada por el rechazo por parte del huésped. Sin embargo, presentan las ventajas de posibilidad de estandarización y fabricación a gran escala, producción a partir de fuentes celulares óptimas, menor coste de fabricación, y de permitir el tratamiento inmediato del paciente e incluso re-tratamientos si se considera necesario.

La modificación genética (adicional a la introducción del CAR) de linfocitos T obtenidos de donantes sanos para eliminar el TCR y las moléculas HLA es un método factible que superaría las limitaciones del uso alogénico de las células CAR-T (TABLA 2). De los distintos métodos posibles, posiblemente la edición con el sistema CRISPR/Cas9 sea el preferido en el futuro por su sencillez y accesibilidad. Sin embargo, esto puede suponer un problema para la expansión celular *ex vivo*, al impedirse con esta estrategia

la expresión de la subunidad CD3, que aporta la principal señal proliferativa de las células T, por la cual se activan estas células *in vitro*. Otro problema es que las células CAR-T HLA⁻ pueden ser reconocidas y eliminadas por linfocitos NK. Una estrategia que puede resultar eficaz es la introducción de las proteínas de fusión B2M-HLA-E (mBE) y B2M-HLA-G (mBG), que se unen respectivamente a NKG2A y a KIR2DL4 y LILRB1, receptores inhibidores de células NK (64).

La alternativa a las modificaciones genéticas adicionales para fabricar células CAR-T alogénicas es usar una fuente de linfocitos poco alorreactiva, cuya única modificación genética es la inserción del transgén CAR. Las células T específicas de virus son sencillas de producir y además confieren protección frente a infecciones virales, algo que puede ser ventajoso en pacientes inmunodeprimidos. Han resultado eficaces en neoplasias relacionadas con la transformación viral como el linfoma de Hodgkin, asociado a la infección por VEB. Estas células se han probado en humanos con un aceptable perfil de seguridad, pero su persistencia *in vivo* dependería de la inmunosupresión del paciente. Los linfocitos T de memoria temprana (CD45RA⁻) presentan TCR poco alorreactivos con reactividad frente a antígenos virales y son fáciles de obtener, lo que las convierte en una opción interesante.

Las células T $\gamma\delta$ tienen un fenotipo citotóxico que las hace idóneas para el tratamiento de tumores tanto hematológicos como sólidos, dada su capacidad de infiltrar tejidos no inflamados. En estos tumores la inmunoterapia ha resultado menos eficaz, por lo que su desarrollo sería de gran interés. Su fabricación es sencilla, aunque su capacidad de proliferación *in vitro* puede ser limitada. Las células CIK tienen un receptor no restringido por HLA y por ello no son alorreactivas por lo que también se están probando.

Las células iPSC son probablemente las de producción más compleja, ya que requieren varias modificaciones adicionales, aunque tienen gran potencial dada su capacidad infinita de autorrenovación y su expansión clonal, que daría como resultado un producto totalmente homogéneo. Una vez optimizada la edición genética, podría convertirse en un tratamiento verdaderamente universal.

Además de lo anteriormente mencionado, una ventaja importante de los productos alogénicos con respecto a los autólogos es que se evita la contaminación del producto con células tumorales del paciente. Se ha descrito un caso en el que una célula neoplásica se transdujo con un CAR anti-CD19, enmascarando estas moléculas CD19 de la propia célula y haciéndose resistente a la terapia (65).

Algunos grupos han establecido protocolos de producción de células CAR-T alogénicas con la plataforma CliniMACS Prodigy asociada a un electroporador con el objetivo de

estandarizar el proceso, hacerlo más eficiente y menos dependiente del operador (54,66).

En conclusión, existen dos grandes tipos de estrategias para evitar la EICH y el rechazo en las terapias CAR-T de uso alogénico: la modificación genética adicional sobre linfocitos T $\alpha\beta$ y la selección de fuentes celulares menos alorreactivas y que no generen rechazo. Además, como se ha explicado previamente, estas estrategias se pueden aplicar de forma concomitante. Actualmente, deben demostrar su eficacia y seguridad en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo, confirmando los resultados ya obtenidos en estudios preclínicos. En este caso, sus ventajas respecto a las terapias autólogas permitirán que su uso se extienda y que un mayor número de pacientes pueda acceder a este tratamiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8.
2. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. «Off-the-shelf» allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(3):185-99. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41573-019-0051-2>
3. Sommer C, Boldajipour B, Kuo TC, Bentley T, Sutton J, Chen A, et al. Preclinical Evaluation of Allogeneic CAR T Cells Targeting BCMA for the Treatment of Multiple Myeloma. *Mol Ther*. 2019;27(6):1126-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.04.001>
4. Choi BD, Yu X, Castano AP, Darr H, Henderson DB, Bouffard AA, et al. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *J Immunother cancer*. noviembre de 2019;7(1):304.
5. Oncology (Cancer) / Hematologic Malignancies Approval Notifications | FDA. Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/oncology-cancer-hematologic-malignancies-approval-notifications>
6. La AEMPS autoriza el CAR-T ARI-0001 del Hospital Clínic para pacientes con leucemia linfoblástica aguda - Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/2021-medicamentosusohumano-3/la-aemps-autoriza-el-car-t-ari-0001-del-hospital-clinic-para-pacientes-con-leucemia-linfoblastica-aguda/>
7. Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim MAA, Hannen RF, Cooper D, et al. Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. abril de 2017;17(4):931-43.
8. Muller YD, Ferreira LMR, Ronin E, Ho P, Nguyen V, Faleo G, et al. Precision Engineering of an Anti-HLA-A2 Chimeric Antigen Receptor in Regulatory T Cells for Transplant Immune Tolerance. *Front Immunol*. 2021;12:686439.
9. Tenspolde M, Zimmermann K, Weber LC, Hapke M, Lieber M, Dywicki J, et al. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2019;103:102289.
10. Martin A, Daris M, Johnston JA, Cui J. HLA-A*02:01-directed chimeric antigen receptor/forkhead box P3-engineered CD4+ T cells adopt a regulatory phenotype and suppress established graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2021;23(2):131-6.
11. Alexander M, Culos K, Roddy J, Shaw JR, Bachmeier C, Shigle TL, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: A Comprehensive Review of Clinical Efficacy, Toxicity, and Best Practices for Outpatient Administration: M. Alexander et al. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(7):558-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2021.01.014>
12. Meng J, Wu X, Sun Z, Xun R, Liu M, Hu R, et al. Efficacy and Safety of CAR-T Cell Products Axicabtagene Ciloleucel, Tisagenlecleucel, and Lisocabtagene Maraleucel for the Treatment of Hematologic Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis . Vol. 11, *Frontiers in Oncology* . 2021. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.698607>

13. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* mayo de 2017;23(9):2255-66.
14. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget.* marzo de 2017;8(10):17002-11.
15. Georgiadis C, Preece R, Nickolay L, Etuk A, Petrova A, Ladon D, et al. Long Terminal Repeat CRISPR-CAR-Coupled «Universal» T Cells Mediate Potent Anti-leukemic Effects. *Mol Ther.* mayo de 2018;26(5):1215-27.
16. Kagoya Y, Guo T, Yeung B, Saso K, Anczurowski M, Wang C-H, et al. Genetic Ablation of HLA Class I, Class II, and the T-cell Receptor Enables Allogeneic T Cells to Be Used for Adoptive T-cell Therapy. *Cancer Immunol Res.* julio de 2020;8(7):926-36.
17. Lee J, Sheen JH, Lim O, Lee Y, Ryu J, Shin D, et al. Abrogation of HLA surface expression using CRISPR/Cas9 genome editing: a step toward universal T cell therapy. *Sci Rep.* octubre de 2020;10(1):1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74772-9>
18. Gautron A-S, Juillerat A, Guyot V, Filhol J-M, Dessez E, Duclert A, et al. Fine and Predictable Tuning of TALEN Gene Editing Targeting for Improved T Cell Adoptive Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* diciembre de 2017;9:312-21.
19. Webber BR, Lonetree C-L, Lin, Kluesner MG, Johnson MJ, Pomeroy EJ, Diers MD, et al. Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors. *Nat Commun.* noviembre de 2019;10(1):5222. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13007-6>
20. Hale M, Lee B, Honaker Y, Leung W-H, Grier AE, Jacobs HM, et al. Homology-Directed Recombination for Enhanced Engineering of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* marzo de 2017;4:192-203.
21. MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, Moser RJ, Hekele A, Wetzel KJ, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol Ther.* abril de 2017;25(4):949-61.
22. Yang M, Tkach D, Boyne A, Kazancioglu S, Duclert A, Poirot L, et al. Optimized two-step electroporation process to achieve efficient nonviral-mediated gene insertion into primary T cells. *FEBS Open Bio.* septiembre de 2022;12(1):38-50.
23. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le Clerre D, Chion-Sotinel I, Derniame S, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for «Off-the-Shelf» Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res.* septiembre de 2015;75(18):3853-64.
24. Valton J, Guyot V, Marechal A, Filhol J-M, Juillerat A, Duclert A, et al. A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy. *Mol Ther.* septiembre de 2015;23(9):1507-18.
25. Zhang J-P, Zhang R, Tsao S-T, Liu Y-C, Chen X, Lu D-P, et al. Sequential allogeneic and autologous CAR-T-cell therapy to treat an immune-compromised leukemic patient. *Blood Adv [Internet].* 24 de julio de 2018;2(14):1691-5. Disponible en: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/2/14/1691/16232/Sequential-allogeneic-and-autologous-CARTcell>
26. Hu Y, Zhou Y, Zhang M, Ge W, Li Y, Yang L, et al. CRISPR/Cas9-Engineered Universal CD19/CD22 Dual-Targeted CAR-T Cell Therapy for Relapsed/Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* mayo de 2021;27(10):2764-72.
27. Sommer C, Cheng H-Y, Nguyen D, Dettling D, Yeung YA, Sutton J, et al. Allogeneic FLT3 CAR T Cells with an Off-Switch Exhibit Potent Activity against AML and Can Be Depleted to Expedite Bone Marrow Recovery. *Mol Ther [Internet].* 7 de octubre de 2020 [citado 19 de mayo de 2022];28(10):2237-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32592688>
28. Panowski SH, Srinivasan S, Tan N, Tacheva-grigorova SK, Mak YSL, Ning H, et al. Preclinical Development and Evaluation of Allogeneic CAR T Cells Targeting CD70 for the Treatment of Renal Cell Carcinoma.
29. Cooper ML, Choi J, Staser K, Ritchey JK, Devenport JM, Eckardt K, et al. An «off-the-shelf» fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia.* septiembre de 2018;32(9):1970-83.
30. Li S, Wang X, Yuan Z, Liu L, Luo L, Li Y, et al. Eradication of T-ALL Cells by CD7-targeted Universal CAR-T Cells and Initial Test of Ruxolitinib-based CRS Management. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* marzo de 2021;27(5):1242-6.
31. Sending CAR T Cells after T-cell Malignancies. *Cancer Discov.* junio de 2020;10(6):754.
32. Galetto R, Lebuhotel C, Poirot L, Gouble A, Toribio ML, Smith J, et al. Pre-TCR α supports CD3-dependent reactivation and expansion of TCR α -deficient primary human T-cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014;1:14021.
33. Michaux A, Mauën S, Breman E, Dheur M-S, Twyffels L, Saerens L, et al. Clinical Grade

- Manufacture of CYAD-101, a NKG2D-based, First in Class, Non-Genetically Edited Allogeneic CAR T-Cell Therapy. *J Immunother* [Internet]. 1 de abril de 2022 [citado 6 de abril de 2022];45(3):150-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35191428>
34. Kamiya T, Wong D, Png YT, Campana D. A novel method to generate T-cell receptor-deficient chimeric antigen receptor T cells. *Blood Adv*. marzo de 2018;2(5):517-28.
 35. Wang X, Cabrera FG, Sharp KL, Spencer DM, Foster AE, Bayle JH. Engineering Tolerance toward Allogeneic CAR-T Cells by Regulation of MHC Surface Expression with Human Herpes Virus-8 Proteins. *Mol Ther*. febrero de 2021;29(2):718-33.
 36. Yan L, Qu S, Shang J, Shi X, Kang L, Xu N, et al. Sequential CD19 and BCMA-specific CAR T-cell treatment elicits sustained remission of relapsed and/or refractory myeloma. *Cancer Med*. enero de 2021;10(2):563-74.
 37. Zhai X, You F, Xiang S, Jiang L, Chen D, Li Y, et al. MUC1-Tn-targeting chimeric antigen receptor-modified V γ 9V δ 2 T cells with enhanced antigen-specific anti-tumor activity. *Am J Cancer Res*. 2021;11(1):79-91.
 38. Nishimoto KP, Barca T, Azameera A, Makkouk A, Romero JM, Bai L, et al. Allogeneic CD20-targeted $\gamma\delta$ T cells exhibit innate and adaptive antitumor activities in preclinical B-cell lymphoma models. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2 de febrero de 2022;11(2):e1373-e1373. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35136603>
 39. Burnham RE, Zoine JT, Story JY, Garimalla SN, Gibson G, Rae A, et al. Characterization of Donor Variability for $\gamma\delta$ T Cell ex vivo Expansion and Development of an Allogeneic $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy. *Front Med*. 2020;7:588453.
 40. Rozenbaum M, Meir A, Aharony Y, Itzhaki O, Schachter J, Bank I, et al. Gamma-Delta CAR-T Cells Show CAR-Directed and Independent Activity Against Leukemia. *Front Immunol*. 2020;11:1347.
 41. Polito VA, Crisantielli R, Weber G, Del Bufalo F, Belardinelli T, Arnone CM, et al. Universal Ready-to-Use Immunotherapeutic Approach for the Treatment of Cancer: Expanded and Activated Polyclonal $\gamma\delta$ Memory T Cells. *Front Immunol*. 2019;10:2717.
 42. Makkouk A, Yang XC, Barca T, Lucas A, Turkoz M, Wong JTS, et al. Off-the-shelf V δ 1 gamma delta T cells engineered with glypican-3 (GPC-3)-specific chimeric antigen receptor (CAR) and soluble IL-15 display robust antitumor efficacy against hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2021;9(12).
 43. Fleischer LC, Becker SA, Ryan RE, Fedanov A, Doering CB, Spencer HT. Non-signaling Chimeric Antigen Receptors Enhance Antigen-Directed Killing by $\gamma\delta$ T Cells in Contrast to $\alpha\beta$ T Cells. *Mol Ther oncolytics*. septiembre de 2020;18:149-60.
 44. Wang Z, McWilliams-Koeppen HP, Reza H, Ostberg JR, Chen W, Wang X, et al. 3D-organoid culture supports differentiation of human CAR+ iPSCs into highly functional CAR T cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 7 de abril de 2022 [citado 14 de mayo de 2022];29(4):515-527.e8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35278370>
 45. From Pluripotent Stem to CAR T Cells. Vol. 8, *Cancer discovery*. United States; 2018. p. OF5.
 46. Harada S, Ando M, Ando J, Ishii M, Yamaguchi T, Yamazaki S, et al. Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma. *Mol Ther* [Internet]. 2022;30(2):534-49. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S15250016211005001>
 47. Wang B, Iriguchi S, Waseda M, Ueda N, Ueda T, Xu H, et al. Generation of hypoinmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng* [Internet]. mayo de 2021;5(5):429-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41551-021-00730-z>
 48. Barker J, Hanash A. Cord blood T cells are «completely different». *Blood*. diciembre de 2015;126(26):2778-9.
 49. TONGCUN Z, CHAOJIANG GU. Method for preparing general CAR-T cell by using CD3 positive T cell from umbilical blood [Internet]. CN: WUHAN BIO RAID BIOLOGICAL TECH CO LTD OP - CN 201811640507 A; 2019. Disponible en: <https://lens.org/051-122-512-220-409>
 50. Van Caenegem Y, De Munter S, Tieppo P, Goetgeluk G, Weening K, Verstichel G, et al. Antigen receptor-redirectioned T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities. *Oncoimmunology*. 2017;6(3):e1283460.
 51. J HR, KATHY K, TIANJIAN LI. PLACENTA-DERIVED ALLOGENEIC CAR-T CELLS AND USES THEREOF [Internet]. CA: CELULARITY INC OP - US 201862774142 P OP - US 201962878736 P OP - US 2019/0064074 W; 2020. Disponible en: <https://lens.org/031-875-385-449-438>
 52. Boyd N, Cartledge K, Cao H, Evtimov V, Pupovac A, Trounson A, et al. 'Off-the-Shelf' Immunotherapy: Manufacture of CD8+ T Cells Derived from Hematopoietic Stem Cells. Vol. 10, *Cells*. 2021.
 53. LIPING LIU, JIAPING HE, ANYUN MA. Chimeric antigen receptor T cell derived from umbilical cord blood [Internet]. CN: GRACELL BIOTECHNOLOGIES SHANGHAI CO LTD OP - CN 201810582916 A; 2019. Disponible en: <https://lens.org/140-103-148-954-432>
 54. Fernández L, Fernández A, Mirones I, Escudero A, Cardoso L, Vela M, et al. GMP-Compliant

- Manufacturing of NKG2D CAR Memory T Cells Using CliniMACS Prodigy. *Front Immunol.* 2019;10(October):1-12.
55. Kim-Hoehamer YI, Riberdy JM, Zheng F, Park JJ, Shang N, Métais JY, et al. Development of a cGMP-compliant process to manufacture donor-derived, CD45RA-depleted memory CD19-CAR T cells. *Gene Ther.* 2022;(November):1-10.
56. Wang X, Naranjo A, Brown CE, Bautista C, Wong CW, Chang W-C, et al. Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8⁺ central memory T cells manufactured at clinical scale. *J Immunother.* 2012;35(9):689-701.
57. Omer B, Castillo PA, Tashiro H, Shum T, Huynh MTA, Cardenas M, et al. Chimeric antigen receptor signaling domains differentially regulate proliferation and native T cell receptor function in virus-specific T cells. *Front Med.* 2018;5(DEC):1-13.
58. Nakazawa Y, Huye LE, Salsman VS, Leen AM, Ahmed N, Rollins L, et al. PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther.* 2011;19(12):2133-43.
59. Savoldo B, Rooney CM, Di Stasi A, Abken H, Hombach A, Foster AE, et al. Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30 ζ artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood.* 2007;110(7):2620-30.
60. Perna SK, Pagliara D, Mahendravada A, Liu H, Brenner MK, Savoldo B, et al. Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirected cytotoxic T lymphocytes (CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition. *Clin Cancer Res.* 2014;20(1):131-9.
61. Omer B, Cardenas MG, Pfeiffer T, Daum R, Huynh M, Sharma S, et al. A Co-stimulatory CAR Improves TCR-based Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol Res [Internet].* 2022;512-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35176142>
62. Magnani CF, Turazzi N, Benedicenti F, Calabria A, Tenderini E, Tettamanti S, et al. Immunotherapy of acute leukemia by chimeric antigen receptor-modified lymphocytes using an improved Sleeping Beauty transposon platform. *Oncotarget.* agosto de 2016;7(32):51581-97.
63. Yepes-Nuñez JJ, Urrútia G, Romero-García M, Alonso-Fernández S. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Rev Esp Cardiol.* 2021;74(9):790-9.
64. Guo Y, Xu B, Wu Z, Bo J, Tong C, Chen D, et al. Mutant B2M-HLA-E and B2M-HLA-G fusion proteins protects universal chimeric antigen receptor-modified T cells from allogeneic NK cell-mediated lysis. *Eur J Immunol.* octubre de 2021;51(10):2513-21.
65. Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med.* 2018;24(10):1499-503. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0201-9>
66. Alzubi J, Lock D, Rhiel M, Schmitz S, Wild S, Mussolino C, et al. Automated generation of gene-edited CAR T cells at clinical scale. *Mol Ther Methods Clin Dev.* marzo de 2021;20:379-88.

ANEXO I: SIGLAS

1. AAV: *Adenoassociated Virus* – Virus Adenoasociado
2. aAPC: Células Presentadoras De Antígenos artificiales
3. B2M: Beta 2 Microglobulina
4. BCMA: *B Cell Maturation Antigen* - Antígeno De Maduración De Linfocitos B
5. CAR: *Chimeric Antigen Receptor* – Receptor De Antígeno Quimérico
6. Cas9: *CRISPR associated protein 9* – Proteína asociada a CRISPR 9
7. CIITA: *Class II, major histocompatibility complex, Transactivator* - Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad Clase II
8. CIKs *Cytokine-Induced Killer Cells* - Células Asesinas Inducidas por Citocinas
9. CMV: Citomegalovirus
10. CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Y Regularmente Interespaciadas
11. CRS: *Cytokine Release Síndrome* - Tormenta De Citocinas
12. CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* - Antígeno 4 Del Linfocito T Citotóxico
13. EICH: Enfermedad Injerto Contra Huésped
14. FDA: *Food And Drug Administration* – Administración De Alimentos Y Medicamentos (de EE.UU.)
15. gRNA RNA guía
16. HLA: *Human Leukocyte Antigen* – Antígeno Leucocitario Humano
17. ICANS: *Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome* - neurotoxicidad asociada a células inmunes
18. IL: Interleucina
19. iPSC: induced Pluripotent Stem Cell - Células Madre Pluripotentes Inducidas
20. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda
21. MHC: *Major Histocompatibility Complex* – Complejo Mayor De Histocompatibilidad
22. mRNA: RNA mensajero
23. NHEJ: *Non-Homologous End Joining* – Reparación de Extremos No Homólogos
24. NK: *Natural Killer* – Asesinas naturales
25. NSCAR: *Non Signaling CAR* - CAR no señalizador
26. PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* - Células Mononucleares De Sangre Periférica

- 27. PD1: *Programmed cell Death receptor 1* – Receptor de Muerte Celular Programada 1
- 28. TALEN: *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* - Nucleasa De Actividad Similar A Activador De Transcripción
- 29. TCR: *T Cell Receptor* - Receptor de Célula T
- 30. TPH: Trasplante De Progenitores Hematopoyéticos
- 31. TRAC: *T Cell Receptor Alpha Constan Chain* – Cadena Constante Alfa del Receptor de Célula T
- 32. SB: *Sleeping Beauty*
- 33. SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2* - Coronavirus Tipo 2 Causante Del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
- 34. VEB: Virus de Epstein-Barr
- 35. VHB: Virus de la Hepatitis B
- 36. VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- 37. VVZ: Virus Varicela-Zóster

ANEXO II: REFERENCIAS NO CITADAS INCLUIDAS EN LA REVISIÓN

1. Sahillioglu AC, Toebes M, Apriamashvili G, Gomez R, Schumacher TN. CRASH-IT Switch Enables Reversible and Dose-Dependent Control of TCR and CAR T-cell Function. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2021 [citado 25 de mayo de 2022];9(9):999-1007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34193461>
2. Zeng J, Tang SY, Wang S. Derivation of mimetic $\gamma\delta$ T cells endowed with cancer recognition receptors from reprogrammed $\gamma\delta$ T cell. *PLoS One* [Internet]. 2019 [citado 25 de mayo de 2022];14(5):e0216815. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31071196>
3. Coeshott C, Vang B, Jones M, Nankervis B. Large-scale expansion and characterization of CD3+ T-cells in the Quantum® Cell Expansion System. *J Transl Med* [Internet]. 2019 [citado 25 de mayo de 2022];17(1):258. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31391068>
4. Pampusch MS, Skinner PJ. Transduction and Expansion of Primary T Cells in Nine Days with Maintenance of Central Memory Phenotype. *J Vis Exp* [Internet]. 2020 [citado 25 de mayo de 2022];(157). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32250358>
5. Arcangeli S, Falcone L, Camisa B, De Girardi F, Biondi M, Giglio F, et al. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado 25 de mayo de 2022];11:1217. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32636841>
6. Costaroli E, Rotondi MC, Amini A, Hewitt CJ, Nienow AW, Heathman TRJ, et al. Demonstrating the Manufacture of Human CAR-T Cells in an Automated Stirred-Tank Bioreactor. *Biotechnol J* [Internet]. septiembre de 2020 [citado 25 de mayo de 2022];15(9):e2000177. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32592336>
7. Smith TA. CAR-T Cell Expansion in a Xuri Cell Expansion System W25. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2020 [citado 25 de mayo de 2022];2086:151-63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31707674>
8. Talebi M, Nozad Charoudeh H, Movassaghpour Akbari AA, Baradaran B, Kazemi T. Acellular Wharton's Jelly, Potentials in T-Cell Subtypes Differentiation, Activation and Proliferation. *Adv Pharm Bull* [Internet]. septiembre de 2020 [citado 25 de mayo de 2022];10(4):617-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33072540>
9. Jozwik A, Dunlop A, Sanchez K, Benjamin R. Monitoring Allogeneic CAR-T Cells Using Flow Cytometry. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2020 [citado 25 de mayo de 2022];2097:293-308. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31776934>
10. Gogishvili T, Danhof S, Prommersberger S, Rydzek J, Schreder M, Brede C, et al. SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7+ normal lymphocytes. *Blood* [Internet]. 2017 [citado 25 de mayo de 2022];130(26):2838-47. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29089311>
11. Lamture G, Baer A, Fischer JW, Colon-Moran W, Bhattarai N. TCR-independent Activation in Presence of a Src-family Kinase Inhibitor Improves CAR-T Cell Product Attributes. *J Immunother* [Internet]. 2022 [citado 25 de mayo de 2022];45(3):139-49. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34802014>
12. Stenger D, Stief TA, Kaeuferle T, Willier S, Rataj F, Schober K, et al. Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood* [Internet]. 2020 [citado 25 de mayo de 2022];136(12):1407-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32483603>
13. Locke FL, Zha Y, Zheng Y, Driessens G, Gajewski TF. Conditional deletion of PTEN in peripheral T cells augments TCR-mediated activation but does not abrogate CD28 dependency or prevent anergy induction. *J Immunol* [Internet]. 15 de agosto de 2013 [citado 25 de mayo de 2022];191(4):1677-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851688>
14. Numbenjapon T, Serrano LM, Chang W-C, Forman SJ, Jensen MC, Cooper LJJ. Antigen-independent and antigen-dependent methods to numerically expand CD19-specific CD8+ T cells. *Exp Hematol* [Internet]. julio de 2007 [citado 25 de mayo de 2022];35(7):1083-90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588477>
15. Juillerat A, Tkach D, Yang M, Boyne A, Valton J, Poirot L, et al. Straightforward Generation of Ultrapure Off-the-Shelf Allogeneic CAR-T Cells. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 [citado 25 de mayo de 2022];8:678. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32671047>
16. Brown CE, Rodriguez A, Palmer J, Ostberg JR, Naranjo A, Wagner J, et al. Off-the-shelf, Steroid Resistant, IL13R α 2-Specific CAR T Cells for Treatment of Glioblastoma. *Neuro Oncol* [Internet]. 31 de enero de 2022 [citado 25 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35100373>
17. B MT, Y MK, R FLM, A CC. Modified T cells and methods of making and using the same [Internet]. AU: HARVARD COLLEGE OP - US 201562139479 P OP - US 2016/0024554 W; 2017. Disponible en: <https://lens.org/073-618-847-855-198>

18. NATHAN YEE, RYAN L, CALVIN C, SARA C, JEFFREY T, DANIEL C, et al. PROCESS FOR PRODUCING DONOR-BATCHED CELLS EXPRESSING A RECOMBINANT RECEPTOR [Internet]. WO: JUNO THERAPEUTICS INC OP - US 202063024505 P; 2021. Disponible en: <https://lens.org/165-680-978-295-058>
19. YUFANG SHI, ZHENG G, YONGJING C. Method and kit for inducing hematopoietic stem cells to be differentiated into early T-lineage cells [Internet]. CN: UNIV SUZHOU OP - CN 201910415089 A; 2019. Disponible en: <https://lens.org/104-876-089-693-066>
20. LI Z, BOK LEEJ, DANIEL V, ISMAT K, DALAM LY, LONG LYSZE. GENETICALLY ENGINEERED DOUBLE NEGATIVE T CELLS AS AN ADOPTIVE CELLULAR THERAPY [Internet]. WO: UNIV HEALTH NETWORK OP - US 201962944634 P; 2021. Disponible en: <https://lens.org/037-866-692-131-482>
21. M RC, NATALIA LD, SANDHYA S, DIMITRIOS W. Platform for activation and expansion of virus-specific T-cells [Internet]. AU: BAYLOR COLLEGE MEDICINE OP - US 201662395438 P OP - US 2017/0051284 W; 2019. Disponible en: <https://lens.org/132-111-743-848-116>
22. SADELAIN M, STEPHAN M. CONSTITUTIVE EXPRESSION OF COSTIMULATORY LIGANDS ON ADOPTIVELY TRANSFERRED T LYMPHOCYTES [Internet]. JP: MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER OP - US 92114407 P; 2020. Disponible en: <https://lens.org/006-722-876-243-879>
23. JUN LI, PENGCHAO Z, ZHAO XU, LING HE, WEIKANG LIU, YUCHEN J, et al. ALLOGENEIC CAR-T CELL, PREPARATION THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF [Internet]. CA: FUNDAMENTA THERAPEUTICS INC OP - CN 201910323948 A OP - CN 2020086032 W; 2020. Disponible en: <https://lens.org/121-555-291-041-204>
24. M CP. METHODS AND COMPOSITIONS TO IMPROVE THE SAFETY AND EFFICACY OF CELLULAR THERAPIES [Internet]. CA: UNIV SOUTHERN CALIFORNIA OP - US 201962794506 P OP - US 2020/0014237 W; 2020. Disponible en: <https://lens.org/003-603-126-652-891>
25. GUOHUANG FAN. Novel Lck small-molecule inhibitor for inhibiting graft-versus-host disease [Internet]. CN: FAN GUOHUANG OP - CN 201510471992 A; 2015. Disponible en: <https://lens.org/037-939-091-495-509>
26. HUA LIU. Method for preparing universal immune cells and application of universal immune cells [Internet]. CN: SHANGHAI XINGHUA BIOMEDICAL TECH CO LTD OP - CN 202010821035 A; 2020. Disponible en: <https://lens.org/162-062-614-233-625>
27. CÉCILE S-M, PHILIPPE D. NEW MESOTHELIN SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS (CAR) FOR SOLID TUMORS CANCER IMMUNOTHERAPY [Internet]. WO: CELLECTIS OP - DK PA201970835 A; 2021. Disponible en: <https://lens.org/151-048-252-211-17X>
28. YANDONG Z, XIANGLU LI, HAITAO XIE. Preparation method of universal heterologous CAR-T cells and application [Internet]. CN: GUANGDONG WANHAI CELL BIOTECHNOLOGY CO LTD OP - CN 201610994623 A; 2017. Disponible en: <https://lens.org/000-560-945-307-665>
29. HUA LIU. METHOD FOR PREPARING UNIVERSAL IMMUNE CELLS AND USE THEREOF [Internet]. WO: SHANGHAI XINGHUA BIO PHARMACEUTICAL SCIENCE & TECH CO LTD OP - CN 2020109310 W; 2022. Disponible en: <https://lens.org/119-030-673-156-521>
30. SAAR G. MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD AS A SOURCE OF MODIFIED IMMUNE CELLS [Internet]. US: UNIV PENNSYLVANIA OP - US 202117189970 A OP - US 202062983968 P; 2022. Disponible en: <https://lens.org/011-219-941-582-264>
31. ALKIS KC, AMINA Z. METHODS AND COMPOSITIONS FOR DOSING OF ALLOGENEIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T CELLS [Internet]. US: ALLOGENE THERAPEUTICS INC; 2019. Disponible en: <https://lens.org/028-422-784-468-88X>
32. BRUCE M, DEREK J, AARON M, DANIEL M. METHODS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY, USING LYMPHODEPLETION REGIMENS AND CD19, CD20 OR BCMA ALLOGENEIC CAR T CELLS [Internet]. WO: PREC BIOSCIENCES INC OP - US 201962944868 P OP - US 201962945811 P OP - US 202062987752 P OP - US 202062961629 P; 2021. Disponible en: <https://lens.org/044-949-909-056-063>
33. JUNHUI LINR, SILER P, ADOLFO SC, JOHN VANBT, JOHNSON SB, ARUN B. BCMA CAR-T CELLS WITH ENHANCED ACTIVITIES [Internet]. US: ALLOGENE THERAPEUTICS INC OP - US 202117183689 A OP - US 202063092681 P OP - US 202063053409 P OP - US 202063020713 P OP - US 202062980914 P; 2021. Disponible en: <https://lens.org/040-348-719-023-990>
34. Y SR, A GM. Allogeneic CAR-T platform using HLA-matched bank of iPSCs, and related compositions, systems, and methods [Internet]. TW: ORIG3N INC OP - US 201762553550 P; 2019. Disponible en: <https://lens.org/160-849-031-280-557>
35. ZHUANGWEI QIU, LIGONG QIU, MEIJUAN FU, RUNMING LI, SHIMING NI, YU HAO. Method for preparing general type CAR-T cells by using CRISPR/Cas9+AAV [Internet]. CN: GUANGZHOU BAIYUSHAN BAIDI BIOTECHNOLOGY CO LTD OP - CN 201811602586 A; 2019. Disponible en: <https://lens.org/035-197-630-248-812>
36. SONJA S, TOBIAS D. CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T CELLS DERIVED FROM IMMUNOENGINEERED PLURIPOTENT STEM CELLS [Internet]. CA: UNIV CALIFORNIA OP - US

- 201862698941 P OP - US 2019/0042123 W; 2020. Disponible en: <https://lens.org/129-648-825-320-86X>
37. YAJIN NI, HONGXIU N, M LEEJ, W LM. METHODS FOR ENHANCING TCRab+ CELL DEPLETION [Internet]. US: ALLOGENE THERAPEUTICS INC OP - US 202016826102 A OP - US 201962821768 P; 2020. Disponible en: <https://lens.org/127-917-573-893-257>
 38. WEI Z, WULING LI, XIZHEN Z, JUANJUAN S. UNIVERSAL CAR-T CELL, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF [Internet]. EP: CHONGQING PREC BIOTECH COMPANY LIMITED OP - CN 201710983276 A OP - CN 2018103714 W; 2020. Disponible en: <https://lens.org/040-725-545-643-348>
 39. WEIYUE GU. UCAR immune cell used for treating T cell tumor [Internet]. CN: BEIJING CHINEO MEDICAL TECH CO LTD OP - CN 201910178766 A; 2020. Disponible en: <https://lens.org/119-255-230-377-461>
 40. HAIJUAN J, XIAOYUN S, HUIYING LIU, FANLI XU, SHAOWEN MA, DAN Z. Universal-type CAR-T cell based on base editing and preparation method and application thereof [Internet]. CN: SUZHOU MAOXING BIOTECHNOLOGY CO LTD OP - CN 201910075912 A; 2019. Disponible en: <https://lens.org/160-567-746-256-846>
 41. SIMON B, EYTAN B. CD52-DEFICIENT CELLS FOR ADOPTIVE CELL THERAPY [Internet]. WO: CELYAD ONCOLOGY S A OP - EP 19181070 A; 2020. Disponible en: <https://lens.org/034-662-176-069-017>
 42. SHUYUAN Z, WEI XU, HONG LIN. GENETICALLY ENGINEERED CELL USED FOR TREATING TUMOUR [Internet]. WO: SINOSHENG SHENZHEN GENE IND DEVELOPMENT CO LTD OP - CN 201810846001 A OP - CN 201910527599 A; 2020. Disponible en: <https://lens.org/069-118-538-766-567>
 43. MARK B, TONY HO, DEMETRIOS K, EWELINA M, ALEXANDER T.J. ALLOGENEIC CELL THERAPY OF B CELL MALIGNANCIES USING GENETICALLY ENGINEERED T CELLS TARGETING CD19 [Internet]. WO: CRISPR THERAPEUTICS AG OP - US 202063094252 P OP - US 202163140664 P OP - US 202163164690 P OP - US 202163215191 P OP - US 202163254226 P; 2022. Disponible en: <https://lens.org/097-286-004-736-580>
 44. ALEXANDER T.J, DEMETRIOS K, EWELINA M, MARK B. ALLOGENEIC CELL THERAPY OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA USING GENETICALLY ENGINEERED T CELLS TARGETING CD19 [Internet]. US: CRISPR THERAPEUTICS AG OP - US 202117359041 A OP - US 202163164685 P OP - US 202063044456 P OP - US 202063044388 P; 2022. Disponible en: <https://lens.org/104-281-500-434-011>
 45. NEIL CLJ, HIROKI T. CAR+ T cells genetically modified to eliminate expression of T-cell receptor and/or HLA [Internet]. US: UNIV TEXAS OP - US 201214358828 A OP - US 201161561364 P OP - US 2012/0065506 W; 2019. Disponible en: <https://lens.org/003-545-142-230-725>
 46. C WS, E IT, SANTOSH K, BORIS M, S SJ. UNIVERSAL DONOR CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR CELLS [Internet]. US: BATU BIOLOGICS INC OP - US 201615046259 A OP - US 201562117161 P; 2016. Disponible en: <https://lens.org/029-590-741-287-287>
 47. CHRISTOPHE F, MARINA D, FABRICE L. CAR-T CELLS TARGETING IL-1RAP AND THEIR USE [Internet]. CA: FRANCAIS DU SANG ETS; 2019. Disponible en: <https://lens.org/183-500-300-232-573>
 48. XINXIN W, ZHONGDONG SHI, LIPING LIU, CHUNHUI Y, JING SUN, SONGBAI CAI, et al. UNIVERSAL CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T-CELL PREPARATION TECHNIQUE [Internet]. EP: GRACELL BIOTECHNOLOGIES SHANGHAI CO LTD OP - CN 201710797952 A OP - CN 2018104418 W; 2020. Disponible en: <https://lens.org/167-419-475-291-518>
 49. A V-ID, CHARLES PT, JOHNSON SB. METHODS OF MANUFACTURING ALLOGENEIC CAR T CELLS [Internet]. EP: ALLOGENE THERAPEUTICS INC OP - US 201962839449 P OP - US 2020/0029722 W; 2022. Disponible en: <https://lens.org/163-428-598-003-423>

ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN DE CÉLULAS CAR-T PARA USO ALOGÉNICO: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA



Universidad de Valladolid
Facultad de Medicina



AUTOR: CARLOS ACEBAL ARRANZ
TUTORA: MARGARITA GONZÁLEZ-VALLINAS GARRACHÓN

INTRODUCCIÓN

Las células CAR-T son linfocitos T que expresan un receptor de antígeno químico que permite reconocer antígenos tumorales. La mayoría de las terapias aprobadas emplean linfocitos T autólogos y, aunque han obtenido muy buenos resultados, tienen limitaciones que pueden superarse empleando linfocitos de donantes sanos: elevados costes y tiempo de producción, dificultades de estandarización y disfunción de los linfocitos T autólogos. Sin embargo, el desarrollo de terapias CAR-T alogénicas se enfrenta a dos retos principales: evitar la enfermedad injerto-contra-huésped y el rechazo por parte del receptor (1). En esta revisión sistemática se recogen las distintas estrategias que se están desarrollando para la producción de células CAR-T para uso alogénico.

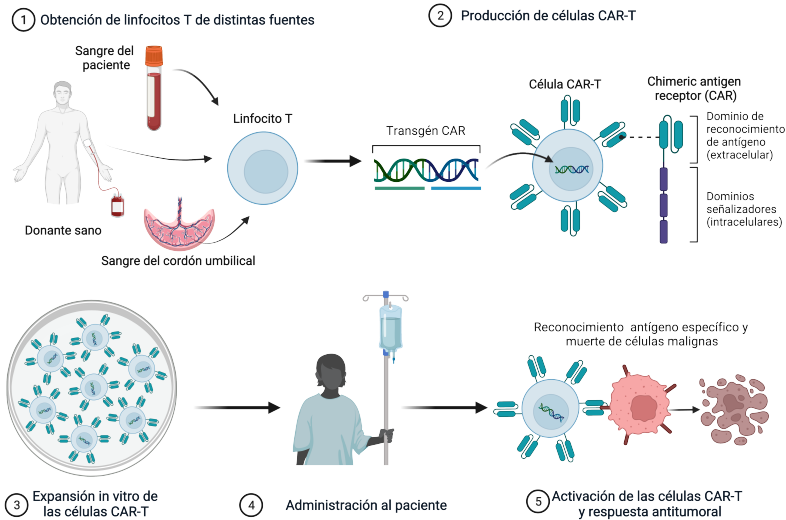


FIGURA 1: Resumen de la terapia con células CAR-T.

METODOLOGÍA

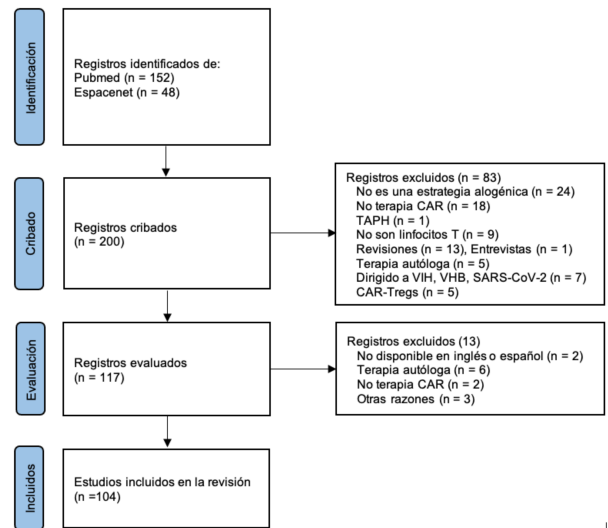


FIGURA 2: Diagrama de flujo que resume el proceso de selección de estudios incluidos en la revisión sistemática. TAPH- Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. *trabajos que no describen una estrategia para uso alogénico de células CAR-T.

RESULTADOS

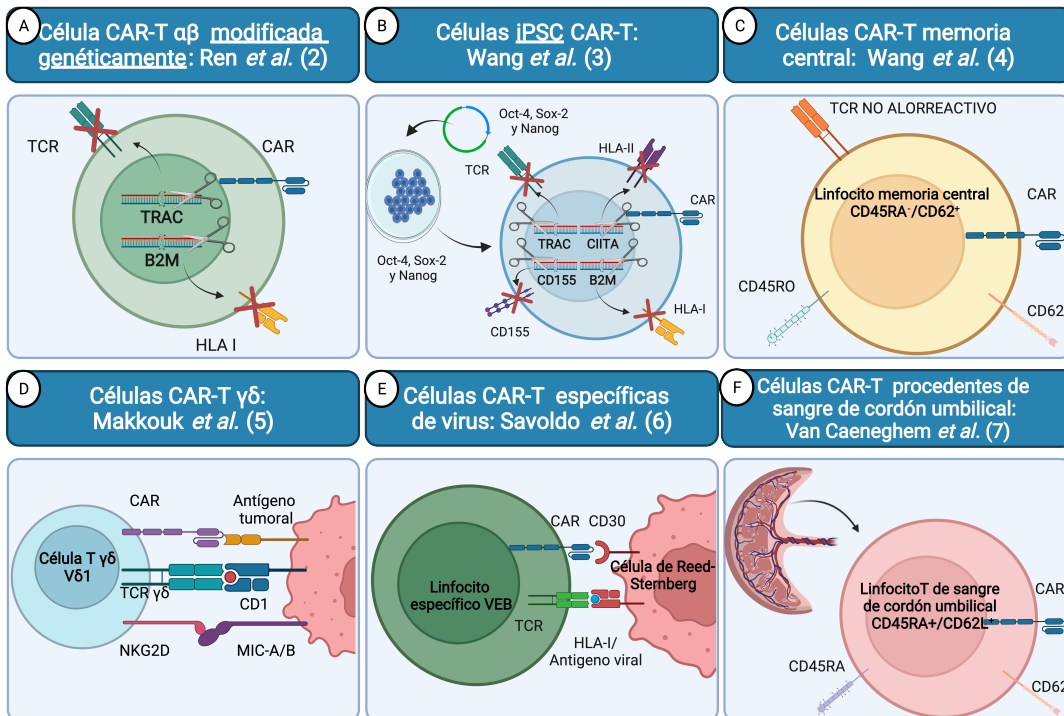


Figura 3: Ejemplos representativos de células CAR-T alogénicas (A) con modificaciones genéticas adicionales, (B) derivada de células iPSC, (C) derivada de células memoria central, (D) derivada de linfocitos T $\gamma\delta$, (E) específica de virus y (F) procedente de sangre de cordón umbilical.

CONCLUSIÓN

Existen dos grandes tipos de estrategias para evitar la EICH y el rechazo en las terapias CAR-T de uso alogénico: la modificación genética adicional sobre linfocitos T $\alpha\beta$ y la selección de fuentes celulares menos alorreactivas. Además, existe la posibilidad de combinarlas. Deberán de mostrar eficacia y seguridad en ensayos, pero sus ventajas las confieren el potencial de incorporarse a la práctica clínica y llegar a un gran número de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Depil S, et al. «Off-the-shelf» allogeneic CAR T cells: development and challenges. Nat Rev Drug Discov.2020;19(3):185-99.
- Ren J, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res. 2017;23(9):2255-66.
- Wang Z, et al. Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells. Nat Biomed Eng. 2021;5(5):429-40.
- Wang X, et al. Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8+ central memory T cells manufactured at clinical scale. J Immunother. 2012;35(9):689-701.
- Makkouk A, et al. Off-the-shelf Vδ1 gamma delta T cells engineered with glypican-3 (GPC-3)-specific chimeric antigen receptor (CAR) and soluble IL-15 display robust antitumor efficacy against hepatocellular carcinoma. J Immunother Cancer. 2021;9(12).
- Savoldo B et al. Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30 γ artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. Blood. 2007;110(7):2620-30.
- Van Caeneghem Y, et al. Antigen receptor-redirection T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities. Oncoimmunology. 2017;6(3):e1283460.