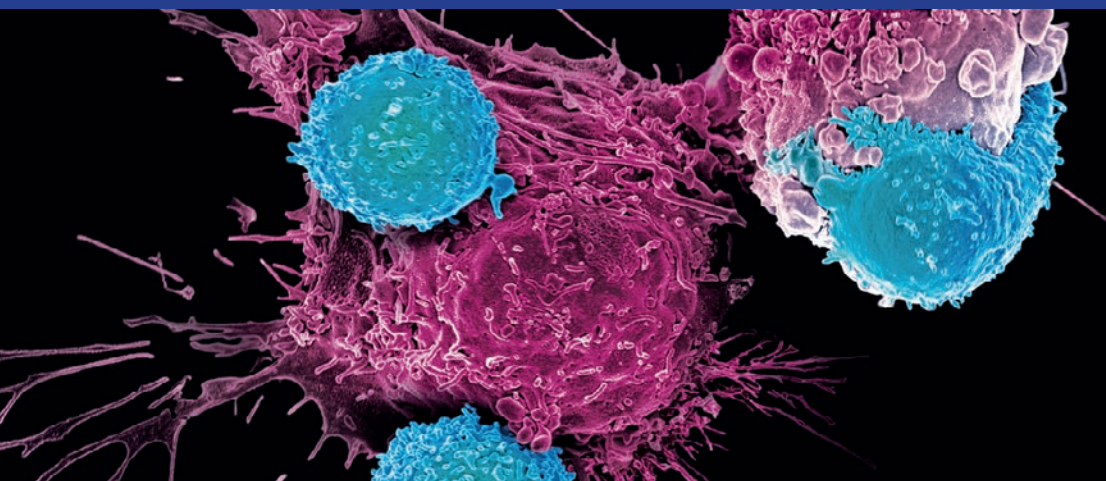


Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro



Coordinador científico:
Dr. José Antonio Pérez-Simón

Con el aval científico de:



Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia

Con la colaboración de:



FISEVI

Fundación Pública Andaluza para la
Gestión de la Investigación en
Salud de Sevilla



GILEAD

Advancing Therapeutics.
Improving Lives.



Bristol Myers Squibb™

Celgene | A Bristol Myers Squibb Company

**Terapia
celular con
linfocitos
CAR-T:
presente
y futuro**

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Coordinador científico:

Dr. José Antonio Pérez-Simón

Jefe del Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío,
Instituto de Biomedicina (IBIS) y Universidad de Sevilla, Sevilla.

Con el aval científico de:



Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia

Con la colaboración de:



FISEVI

Fundación Pública Andaluza para la
Gestión de la Investigación en
Salud de Sevilla



GILEAD

Advancing Therapeutics.
Improving Lives.



Bristol Myers Squibb™

Celgene | A Bristol Myers Squibb Company

Edición y producción

MEDICAL MEDIA, SCP
Calle Salut, 20
08960 Sant Just Desvern
info@farmacosalud.es

Diseño

dtm+tagstudy

ISBN-13 978-84-121409-4-1

Reservados todos los derechos.

No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito del titular del Copyright.

Índice

Glosario	9
Prólogo	13
<i>José Antonio Pérez-Simón</i>	
CAPÍTULO 1	
Indicaciones actuales de la terapia con linfocitos CAR-T, ensayos pivotaes y experiencia clínica en leucemia y linfoma	17
<i>Sara Redondo y Joaquín Martínez</i>	
CAPÍTULO 2	
Nuevas indicaciones CAR-T	39
<i>Javier Briones</i>	
CAPÍTULO 3	
Complicaciones de la terapia celular CAR-T	57
<i>Julio Delgado y Valentín Ortiz-Maldonado</i>	
CAPÍTULO 4	
Desarrollo de nuevos CAR-T: el futuro ya está aquí	89
<i>Estefanía García Guerrero</i>	

Glosario

ACT: terapia adoptiva de células T

alo-TPH: alotrasplante de progenitores hematopoyéticos

ASTCT: *American Society for Transplantation and Cellular Therapy*

BAFF: estimulador de linfocitos B

BCMA: antígeno de maduración de células B

BLyS: estimulador de linfocitos B

CAPD: escala de valoración de delirio pediátrico de Cornell

CAPS: síndromes periódicos asociados a criopirina

CAR: receptor de antígeno quimérico

CAR-T: células T anti-receptor de antígeno quimérico

CIBMTR: *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interesparadas

CTCAE: *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

DAMP: patrones moleculares asociados al daño

EBMT: *European Society for Blood and Marrow Transplantation*

ECM: enfermedad de Castleman multicéntrica

ECOG: Escala del *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFRt: receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico

EHC: enfermedad de Hodgkin clásica

EICR: enfermedad del injerto contra receptor

EMA: *European Medicines Agency*

EMR: enfermedad mínima residual

FDA: *Food and Drug Administration*

GM-CSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos

GSI: inhibidores de la γ -secretasa

HLA: antígeno leucocitario humano

ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras

iCAR: *inhibitory CAR*

iCasp9: gen inducible de caspasa 9

IFN- γ : interferón-gamma

IL-1: interleucina-1

IL-2: interleucina-2

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

JACIE: *Joint Accreditation Committee ISCT-Europe*

LAM: leucemia aguda mieloblástica

LBPM: linfoma primario mediastínico de células B grandes

LCM: linfoma de células del manto

LDCGB: linfoma difuso de células grandes B

LF: linfoma folicular

LFt: linfoma folicular transformado

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LLA-B: leucemia linfoblástica aguda de células B

LLC: leucemia linfática crónica

LNH: linfoma no Hodgkin

LNH-B: linfoma no Hodgkin de células B

LPM: linfoma primario mediastínico

MAS: síndrome de activación macrofágica

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MM: mieloma múltiple

NK: *natural killer*

NSG: secuenciación de última generación

PCR: proteína C reactiva

R/R: recaída/refractariedad

RC: remisión completa

RCi: remisión completa con recuperación hematológica incompleta

RFA: reactantes de fase aguda

RP: remisión parcial

sBCMA: proteína de antígeno de maduración de células B soluble

scFv: fragmento variable de cadena sencilla

SG: supervivencia global

SLC: síndrome de liberación de citocinas

SLP: supervivencia libre de progresión

SNC: sistema nervioso central

TCM: células T de memoria central

TCR: receptor de células T

TM: dominio transmembrana

TN: células T *naïve*

TN: transferencia nuclear

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TPH: progenitores hematopoyéticos

TRG: tasa de respuestas global

TSCM: célula madre T de memoria

VE: vascular endotelial

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Prólogo

En diciembre de 2012, el periódico *The York Times* se hace eco de un avance significativo en el tratamiento del cáncer: Emma Whitehead recibe linfocitos CAR-T como tratamiento de una leucemia aguda linfoblástica en recaída/refractaria. En 2013, la revista *Science* reconoce la inmunoterapia en el cáncer como uno de los avances más relevantes de la ciencia. Desde entonces, la terapia basada en el uso de linfocitos CAR-T ha demostrado ser una ventana al futuro con un presente brillante. Para llegar a este punto, pioneros como Carl June o, antes aún, Gideon Gross o Zelig Eshhar desarrollan durante años un concepto disruptivo, basado en el diseño de un antígeno quimérico que permitiría dirigir la respuesta inmune celular frente a células portadoras de un antígeno específico.

En realidad, se trata del último paso de un proceso mucho más largo en el que, a lo largo de muchos años, numerosos investigadores han intentado explotar el efecto citotóxico del sistema inmune para reconocer y destruir células tumorales. Curiosamente, la primera referencia escrita a la capacidad del organismo de protegerse frente a una infección pasada procede de Tucídides que, en el siglo V a.C. describió cómo aquellos sujetos que sobrevivían a la epidemia de la peste no contraían de nuevo la enfermedad. Tenemos que esperar a 1890 para que William Corey plantee la posibilidad de infectar a pacientes con diferentes tumores para estimular el sistema inmune, entrando de lleno, tal vez de manera heterodoxa, en la era de la inmunoterapia. Desde entonces, el desarrollo de anticuerpos monoclonales, el descubrimiento de las señales co-inhibitorias (*immune checkpoints*) y el desarrollo de fármacos capaces de inhibirlas, son sólo algunos ejemplos de cómo la inmunoterapia ha ido ganando terreno en el tratamiento del cáncer.

Lejos de ser una quimera, la terapia CAR es ya una realidad a nivel mundial y en España ya son más de 200 los pacientes tratados solamente a lo largo de 2019.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

La terapia CAR-T es, por tanto, el último eslabón de un largo proceso de aprendizaje y desarrollo que está permitiendo utilizar el sistema inmune para atacar al cáncer. En este libro revisamos los resultados e indicaciones actuales de la terapia CAR-T, las potenciales indicaciones futuras en el corto/medio plazo, las complicaciones derivadas de dicho tratamiento y el desarrollo tecnológico presente y futuro en el que se basa la terapia CAR. Los expertos de cada una de estas materias, por tanto, nos llevarán de viaje a través de este camino apasionante que se abre ante nosotros.

José Antonio Pérez-Simón

CAPÍTULO 1

Indicaciones actuales de la terapia con linfocitos CAR-T, ensayos pivotaes y experiencia clínica en leucemia y linfoma

Sara Redondo

Servicio de Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Joaquín Martínez

Universidad Complutense de Madrid y Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid.

Introducción

La inmunoterapia celular adoptiva con células T anti-receptor de antígeno quimérico (CAR-T) ha supuesto un gran cambio en el paradigma de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer. Esta tecnología aprovecha el efecto citotóxico de las células T inmunes dirigiendo su efecto contra antígenos específicos de células tumorales.

La estructura básica de una célula CAR-T incluye 3 componentes principales: un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular de cadena sencilla que se une al antígeno específico de tumor (el más frecuente es CD19), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular.

Los CAR-T de primera generación disponían de una sola cadena CD3 como dominio activador intracelular y con el fin de mejorar su capacidad proliferativa y efecto citotóxico se desarrollaron CAR-T de segunda y tercera generación agregando dominios intracelulares activadores, siendo los más utilizados CD28, CD137 (4-1BB), OX40, y CD27. Se están desarrollando CAR-T frente a múltiples antígenos simultáneamente.

La terapia CAR-T anti CD19 ha demostrado ser eficaz en leucemia aguda linfoblástica de células B (LLA-B) y en linfomas no Hodgkin (LNH), específicamente en linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) en recaída/refractoriedad (R/R) cuando no existen otras opciones de tratamiento disponibles.

Actualmente disponemos de dos productos de células CAR-T (kymriah¹ y yescarta²) aprobados por las agencias reguladoras para uso comercial en Estados Unidos, Europa, Canadá, Japón y Australia, y un tercer producto pendiente de aprobación (lisocabtagene maraleucel) que muestra resultados prometedores en ensayos clínicos.

CAR-T en LLA-B en recaída o refractariedad

La LLA-B es el segundo cáncer más común en la infancia. Presenta una incidencia bimodal de 1,7 casos por cada 100.000 habitantes, ocurriendo el 60% de los casos en <20 años, con un segundo pico en >60 años. Con un tratamiento adecuado se consigue la curación en el 80% de los niños, y el 35% de los adultos, presentando un 15-20% de recaídas, siendo mayor en los grupos de alto riesgo (25-30%).

En el caso de la LLA-B R/R, el tratamiento consiste en quimioterapia de rescate, seguida de alo-trasplante de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), siendo la única opción potencialmente curativa con supervivencia global (SG) a los 5 años en torno al 20-45%. No existe ningún tratamiento estándar para pacientes que recaen tras un aloTPH, con resultados muy pobres.

En pacientes adultos con LLA-B R/R, están aprobados inotuzumab ozogamicina^{6,7} (anticuerpo anti-CD22 conjugado) y blinatumomab (anticuerpo biespecifico anti-CD19).

Inotuzumab ozogamicina consigue tasas de respuestas global (TRG) del 81% con una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 5 meses y una mediana de SG de 7,7 meses. Blinatumomab presenta una TRG del 44% con una mediana de SLP a los 6 meses del 31% y una mediana de SG 7,7 meses; por lo que el pronóstico de estos pacientes es desfavorable, reflejo de una necesidad médica no cubierta.

En agosto de 2017 y en junio de 2018, la FDA y posteriormente la EMA aprobaron kymriah, un tratamiento inmunocelular que consiste en células T autólogas modificadas genéticamente *ex vivo* utilizando un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, utilizando un dominio coestimulador 4-1BB¹.

Se aprobó kymriah para pacientes pediátricos >3 años y adultos jóvenes hasta 25 años con LLA-B R/R postrasplante o en segunda o posterior recaída.

Ajustándose la dosis de CAR-T al peso corporal de los pacientes:

- Paciente <50 kg: 0,2 a 5,0 × 10⁶/kg.
- Paciente >50 kg: 0,1 a 2,5 × 10⁸/kg.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Tras la recolección de las células T hasta la fabricación del CAR-T, es necesario iniciar quimioterapia puente con el fin de controlar la enfermedad.

El uso previo de blinatumomab o de inotuzumab ozogamicin no es una contraindicación absoluta. Se deberían evitar con el fin de minimizar el riesgo de pérdida del antígeno, así como el riesgo de disminuir la expansión y la persistencia del CAR-T.

Se recomienda quimioterapia linfodeplectora a menos que el recuento de glóbulos blancos sea ≤ 1.000 células/ μl ^{9,10}:

- Fludarabina 30 mg/m² iv \times 4 días y ciclofosfamida 500 mg/m² iv \times 2 días o
- Citarabina 500 mg/m² iv \times 2 días y etopósido 150 mg/m² iv \times 3 días (si el paciente presentó previamente una cistitis hemorrágica grado 4 o quimiorrefractoriedad a ciclofosfamida).

Si hubiera un retraso de más de 4 semanas entre la linfodeplección y la perfusión, y el recuento de glóbulos blancos fuera >1.000 células/ μl , el paciente deberá recibir de nuevo la quimioterapia de linfodeplección.

Ensayos pivotaes en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con LLA-B R/R

En la actualidad hay más de 90 ensayos CAR-T disponibles globalmente para pacientes con LLA que se dirigen contra varios antígenos y usan una variedad de vectores virales y estrategias de ingeniería.

La aprobación de kymriah surge del ensayo pivotal ELIANA B2202¹³, donde se evaluó la seguridad y eficacia del tratamiento en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con dos estudios más de soporte (B2205J y B2102J)^{11,12}.

ELIANA B2202

Estudio fase II de un solo brazo, abierto, multicéntrico para pacientes pediátricos >3 años y adultos jóvenes <25 años con LLA-B R/R.

Se incluyeron 92 pacientes de los 107 en los que se realizó el *screening*, y 79 finalmente recibieron kymriah; 13 pacientes no lo recibieron debido a 7 muertes, 7 fracasos de producción y 3 reacciones adversas. La mediana de tiempo desde el *screening* hasta infusión fue de 45 días, recibiendo linfodeplección el 96%. La me-

diana de edad era de 11 años (rango 3-23), 3 terapias previas (rango 1-8) y el 61% había recibido un alo-TPH previo. Se excluyeron los pacientes que habían recibido anti CD19.

Con una mediana de seguimiento de **24 meses**¹⁴, la TRG a los 3 meses fue del 82% (incluyendo remisiones completas [RC] y remisiones completas con recuperación hematológica incompleta [RCi] con enfermedad mínima residual negativa <0,01% por citometría en el 98%) con una mediana de tiempo hasta alcanzar RC/RCi de 29 días. La SLP y SG a los 6 meses fue del 73% y 90,3% y a los 12 meses del 50,5% y del 76,4% respectivamente. No se había alcanzado la mediana de duración de la respuesta a la publicación del estudio. La persistencia de kymriah en sangre fue de más de 20 meses, sin encontrar relación entre la dosis y la expansión máxima (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resultados de eficacia en pacientes con LLA-B R/R (estudio B2202)		
	Pacientes infundidos	Pacientes incluidos
	N = 79	N = 92
TRG con EMR negativa, %	82%	66,30%
DR a 6 meses, %	79,50%	79,50%
DR a 12 meses, %	50,50%	
SG a 6 meses, %	90,30%	77,40%
SG a 12 meses, %	76,40%	70,30%
Mediana de SG, meses	19,1	19,4
SLP a 12 meses, %	50,50%	

TRG: tasa global de respuestas; EMR: enfermedad mínima residual; DR: duración de la respuesta; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión.

Se evaluó la calidad de vida de los pacientes con los cuestionarios PedsQL™ y EQ-5D en los niños mayores de 8 años (n=58) a los 3, 6 y 12 meses postinfusión. Se observó mejoría clínica significativa tras la infusión de kymriah¹⁵.

Las reacciones adversas fueron grado 3-4 en el 73% de los pacientes, ocurriendo sobre todo en las 8 primeras semanas. El 77% presentó síndrome de liberación de citoquinas (SLC) (siendo de grado ≥3 el 49%) con una mediana de inicio de 3 días (rango: 1-22), y una duración de 8 días (rango: 1-36), 44% infecciones por patógenos, 40% neurotoxicidad (ICANS) (siendo de grado ≥3 el 13%), 36% citopenias prolongadas (siendo de grado ≥3 el 30%), y 3% síndrome de lisis tumoral.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Hubo un total de 19 muertes, 2 en los 30 primeros días por hemorragia cerebral y 1 por recaída, y 17 tras los 30 primeros días: 12 por recaída, 1 por encefalitis VHH-6, 1 por micosis sistémica, 1 de causa desconocida y 2 tras nuevos tratamientos frente a la LLA-B R/R (1 por neumonía y 1 por enfermedad hepatobiliar).

Ensayos pivotaes en pacientes adultos con LLA-B R/R

Se encuentran en fase de reclutamiento dos ensayos clínicos para analizar la eficacia y seguridad de dos productos CAR-T para pacientes adultos >18 años con LLA-B R/R.

- CART19-BE-02¹⁶: ensayo fase II, con el objetivo de analizar la eficacia del medicamento en investigación ARI-0001, linfocitos T autólogos de sangre periférica expandidos y transducidos con un lentivirus para expresar un receptor antigénico quimérico con especificidad anti-CD19 (A3B1) conjugado con las regiones coestimuladoras 4-1BB y CD3z. El promotor es el Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).
- ZUMA-3¹⁷: ensayo fase I-II con el objetivo de analizar la eficacia y la seguridad de yescarta. El promotor es Kite.

CAR-T aprobados en pacientes adultos con LDCGB en recaída o refractariedad

El linfoma no Hodgkin (LNH) es un tumor maligno con una incidencia de 20 casos por cada 100.000 habitantes, siendo el más frecuente el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB), seguido del linfoma folicular (LF) y el linfoma de células del manto (LCM)¹⁸.

A pesar de considerarse una neoplasia maligna curable con una tasa de supervivencia a los 5 años del 60%, aproximadamente del 20% al 30% recaen o son refractarios a la terapia de primera línea¹⁹.

El estándar de atención para pacientes en recaída/refractarios es quimioterapia de rescate seguida de auto-TPH²⁰.

Sin embargo, el 40-50% de los pacientes no son elegibles para auto-TPH debido a quimiorrefractariedad o comorbilidades subyacentes. De los que finalmente se trasplantan, el 50-60% recaen, por lo que quedarían muy pocas opciones, incluyendo el alo-TPH, que solo es factible en una minoría de pacientes y cuyos resultados tampoco son excesivamente brillantes^{21,22}.

No existe ningún tratamiento estándar para los pacientes con LDCGB R/R tras dos o más líneas de tratamiento, alcanzando tasas de RC del 7% con una mediana de supervivencia global de 6 meses.

Actualmente, el tratamiento CAR-T ofrece una oportunidad para este grupo de pacientes; se prevén de 400 a 800 candidatos al año en España. Los CAR-T aprobados para adultos con LDCGB R/R, son kymriah y yescarta, basados en los ensayos clínicos de registro JULIET^{23,24} y ZUMA-1²⁵. Un tercer producto pendiente de aprobación es lisocabtagene maraleucel, con resultados prometedores en el ensayo clínico TRANSCEND^{26,27}.

CAR-T aprobados para adultos con LDCGB R/R

Kymriah

Tratamiento inmunocelular aprobado en mayo 2018 por la FDA y en agosto 2018 por la EMA. Contiene tisagenlecleucel, células CAR-T autólogas de segunda generación modificadas genéticamente *ex vivo* con un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, utilizando un dominio coestimulador 4-1BB. El promotor es Novartis.

No se ha establecido la seguridad y eficacia en pacientes pediátricos ni menores de 18 años con LDCGB R/R y tampoco hay experiencia en la fabricación en pacientes con serología positiva para VHB, VHC o VIH.

Se aprobó kymriah para pacientes adultos con LDCGB R/R, incluido el LDCGB transformado de linfoma folicular y el LDCGB con reordenamiento MYC, BCL2 y/o BCL6 tras dos o más líneas de tratamiento sistémico y fracaso a auto-TPH o bien no eran candidatos, siendo la dosis de CAR-T utilizada de 0,6 a 6×10^8 /kg.

Tras la recolección de las células T hasta la fabricación del CAR-T, se podría utilizar terapia puente, si es necesario con el fin de controlar la enfermedad.

Se recomienda administrar quimioterapia linfodeplectora a menos que el recuento de glóbulos blancos sea ≤ 1.000 células/ μ l.

- Fludarabina 25 mg/m² iv \times 3 días y ciclofosfamida 250 mg/m² iv \times 3 días, o
- Bendamustina 90 mg/m² iv \times 2 días (si el paciente presentó previamente una cistitis hemorrágica grado 4 o quimiorrefractoriedad a ciclofosfamida).

Si hubiera un retraso de más de 4 semanas entre la linfodepleción y la perfusión, y el recuento de glóbulos blancos fuera >1.000 células/ μ l, el paciente deberá recibir de nuevo la quimioterapia de linfodepleción.

Yescarta

Tratamiento inmunocelular aprobado en octubre de 2017 por la FDA y agosto 2018 por la EMA. Contiene axicabtagén ciloleucel, células CAR-T autólogas de segunda generación, modificadas genéticamente *ex vivo* mediante transducción retroviral para que expresen un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento variable de la cadena única anti-CD19 murino unido al dominio coestimulador CD28 y al dominio de señalización CD3-zeta. El promotor es Kite.

No se ha establecido la seguridad y eficacia en pacientes pediátricos ni menores de 18 años con LDCGB y tampoco hay experiencia en la fabricación en pacientes con serología positiva para VHB, VHC o VIH.

Yescarta se ha aprobado para pacientes con LDCGB R/R y linfoma B primario mediastínico de células grandes (LBPM) tras dos o más líneas de tratamiento sistémico, siendo la dosis única de CAR-T utilizada de 2×10^6 /kg CAR-T viables (máximo 2×10^8 /kg CAR-T viables para pacientes que pesen >100 kg).

Se administrará yescarta 3 días tras finalizar la quimioterapia lifodeplectora con:

- Fludarabina 30 mg/m² diario iv × 3 días y ciclofosfamida 500 mg/m² iv × 3 días.

Ensayos pivotaes en pacientes adultos con LDCGB R/R

Los CAR-T aprobados para adultos con LDCGB R/R, kymriah y yescarta se basan en los ensayos clínicos de registro JULIET y ZUMA-1 donde se evaluó la seguridad y eficacia del tratamiento comparándolas con los resultados de cohortes (SCHOLAR-1).

JULIET CTL019C2201

Estudio fase II de un solo brazo, multicéntrico que evalúa la eficacia y seguridad de tisagenlecleucel, para pacientes >18 años con LDCGB R/R que habían recibido al menos 2 líneas de tratamiento previo y habían fracasado a auto-TPH o bien no eran candidatos. Fueron excluidos si previamente habían recibido terapia anti CD19, recaída tras alo-TPH, serologías positivas o participación activa del sistema nervioso central (SNC). El promotor es Novartis.

Se incluyeron 147 pacientes y 99 recibieron finalmente kymriah, siendo las causas de no infusión 16 muertes, 12 por decisión médica, 9 fracasos de producción, 3 por decisión del paciente, 2 efectos adversos, 1 desviación grave y 5 pendientes de infusión. En el último análisis se habían incluido 165 pacientes e infundido 115²⁴. La mediana de edad era de 56 años (rango: 22-76), 26% casos doble o triple *hit*, 75,7% habían recibido 2 o 3 líneas (rango: 1-6) y 48,5% auto-TPH previo. El 92% recibió terapia puente, siendo la mediana de tiempo desde el *screening* hasta la infusión de 54 días.

Con una mediana de seguimiento de **14 meses**, el 52% alcanzó TRG, siendo el 40% RC y el 14% RP, con una mediana de duración de la respuesta no alcanzada.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Con una mediana de seguimiento de **24 meses**, el 54% alcanzó TRG, siendo el 40% RC con una mediana de duración de la respuesta no alcanzada. La SG y la SLP fue del 49 y del 66% a los 12 meses, y del 43% y 64% a los 18 meses, con una mediana de SG de 11,7 meses. Se evidenció persistencia del CAR-T hasta 2 años después de infusión sin encontrar relación entre la dosis y la expansión máxima.

Las reacciones más frecuentes en las 8 primeras semanas fueron de grado 3-4; el 58% presentó SLC* (siendo de grado ≥ 3 el 19%) con una mediana de tiempo de inicio de 3 días (rango 1-51 días) y una mediana de duración de 7 días (rango 2-30 días), 21% ICANS (siendo de grado ≥ 3 el 12%), 32% citopenias con duración de >28 días, 34% infecciones (siendo de grado ≥ 3 el 20%) y 1% síndrome de lisis tumoral grado 3.

Hubo un total de 16 muertes, 3 en los 30 primeros días por recaída, y 13 tras los primeros 30 días, 12 por progresión y 1 por enfermedad renal crónica no relacionada con la infusión.

ZUMA-1

Estudio fase I-II de un solo brazo, multicéntrico, que evalúa la eficacia y seguridad de yescarta para pacientes >18 años con LDCGB R/R que habían recibido al menos 2 líneas de tratamiento previo y habían fracasado a auto-TPH o bien no eran candidatos a trasplante. El promotor es Kite.

Se incluyeron 111 pacientes y 101 recibieron yescarta con una mediana de tiempo de 17 días: 77 LDCGB, 8 linfoma primario mediastínico de células B grandes (LBPM) y 16 LDCGB transformado de linfoma folicular R/R. Las causas de no infusión fueron 1 fallo de producción, 4 eventos adversos, 1 muerte por progresión y 2 enfermedades no medibles. La mediana de edad era de 58 años (rango: 23-76), 2-3 líneas (rango: 1-10) y 21% auto-TPH previo. No se permitió terapia puente entre la leucaféresis y la infusión de CAR-T. Recibieron quimioterapia linfodeplectora con fludarabina y ciclofosfamida del -5 a -3, administrándose yescarta en el día 0, a dosis de $2 \times 10^6/\text{kg}$, con una mediana de tiempo entre el *screening* y la infusión de 14 días.

Con una mediana de seguimiento de **15,4 meses**²⁵, el 82% alcanzó TRG, siendo el 54% RC y el 28% RP, con una mediana de inicio de respuesta y de duración de 1 mes (rango 0,8-6), y 8,1 meses. La SG a los 6, 12 y 18 meses fue del 78%, 59%, y 53%, sin

*Para la graduación del síndrome de liberación de citocinas se utilizó la escala de Penn en lugar de la escala de Lee, las cuales no son equiparables.

llegarse a alcanzar la mediana de SG. La SLP a los 6, 12 y 15 meses fue del 49%, 44%, y 41%, respectivamente.

Con una mediana de seguimiento de **27,1 meses**^{28,29}, el 83% alcanzó TRG, siendo el 58% RC y el 25% RP, con una mediana de duración de 11,1 meses. La SG a los 6, 12, 18 y 24 meses fue del 78%, 59%, 53% y 40%, respectivamente, sin llegarse a alcanzar la mediana de SG (12,8-no estimable). La SLP a 18 meses fue del 40%. La respuesta se asoció con mayor concentración de CAR-T en los primeros 28 días tras la infusión.

El 94% presentó SLC (siendo de grado ≥ 3 el 13%) con una mediana de inicio de 2 días (rango: 1-12), y una mediana duración de 7 días (rango: 2-29), 87% ICANS (siendo de grado ≥ 3 el 31%), 78% neutropenia de grado ≥ 3 , 1% síndrome de lisis tumoral de grado 3, y 38% infecciones (siendo el 25% de grado ≥ 3). El perfil de seguridad de yescarta a los 2 años de la infusión fue muy similar a los informes anteriores.

Hubo un total de 54 muertes (4 en la fase I y 50 en la fase II), 50 por progresión (4 tras el análisis de los 12 meses) y 4 por eventos adversos, estando 2 de ellas relacionadas con el tratamiento, 1 debido a linfohistiocitosis hemofagocítica y 1 paro cardíaco.

TRANSCEND NHL 001

Estudio fase I, abierto, multicohorte, multicéntrico, que evalúa la seguridad y eficacia de lisocabtagene maraleucel (liso-cel, JCAR017)^{26,27}. CAR-T autólogo de segunda generación modificado genéticamente *ex vivo* con un vector lentiviral, dominio coestimulador 4-1BB que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19, administrándose de forma separada el CAR-T CD4+ y CD8+ a igual dosis 1:1 (**Figura 1**). El promotor es Celgene.

Se está utilizando en pacientes >18 años con LDCGB R/R de *novo*, transformado de LF y de LLC, LCM, LBPM y LF grado 3b en R/R con al menos 2 líneas de tratamiento previo y fracaso tras auto-TPH, alo-TPH o bien no eran candidatos. Se incluyeron pacientes con afectación del SNC y ECOG hasta 2.

De los 344 pacientes incluidos, finalmente se infundieron 294; siendo las causas de no infusión 50 muertes por progresión, 6 complicaciones relacionadas con la enfermedad, 9 por otras causas y 2 fallos de producción.

El grupo Total analizado incluyó a todos los pacientes de la cohorte tratados con JCAR01. El grupo Core incluyó solo pacientes LDCGB NOS (de *novo* o transformado de LF) con ECOG 0-1, sin alo-TPH previo.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

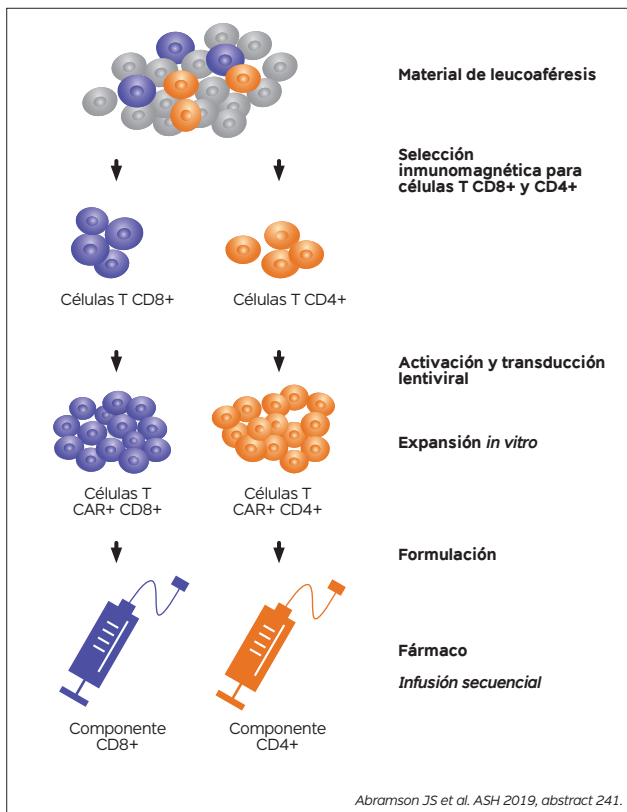


Figura 1. Producción de lisocabtagene.

La mediana de edad era de 63 años (rango: 18-86), 2-3 líneas (rango: 1-8), 33% auto-TPH y 3% alo-TPH previo. Se permitió terapia puente con el fin de controlar la enfermedad, se realizó linfodepleción con fludarabina 30 mg/m² y ciclofosfamida 300 mg/m² iv × 3 días, y se administró lisocabtagene tras 2-7 días a una de estas 3 dosis DL1: 5 × 10⁷/kg, DL2: 1 × 10⁸/kg y DL3: 1,5 × 10⁸/kg.

Con una mediana de seguimiento de **12 meses**, el 73% alcanzó TRG, siendo el 53% RC con una mediana para alcanzar respuesta de 1 mes (0,7-8,9 meses). La mediana de SLP a los 6 y a los 12 meses fue del 51,4 y 44,1% y en los pacientes que habían alcanzado RC del 76,1 y 65,1%. En el 53% de los pacientes el CAR-T persiste al año con una tasa similar de expansión del CD8 y CD4+.

Se evaluó la calidad de vida mediante los cuestionarios EQ-5D-5L, EQ-VAS y EORTC QLQ-C30, donde se objetivó mejoría de la sintomatología desde el primer mes hasta el mes 12³⁰.

El 42% presentó SLC (siendo el 2% de grado ≥ 3) con una mediana de inicio de 5 días, 30% ICANS (siendo de grado 3-4 el 10%), 37% citopenias de grado ≥ 3 , y 12% infecciones de grado ≥ 3 ³¹. Se postula que tanto la dosis como la ratio CD4+ y CD8+ influyen en la incidencia y gravedad del SLC y de la neurotoxicidad.

En la **Tabla 2** se resume la composición, eficacia y toxicidad de los CAR-T para linfoma difuso de células grandes B en recaída/refractoriedad.

Tabla 2. Composición, eficacia y toxicidad de los CAR-T para LDCGB R/R			
	Yescarta	Kymriah	Lisocabtagene
Pacientes incluidos (tratados)	111 (101)	165 (115)	344 (294)
Mediana de seguimiento, meses	27,1	24	12
Dominio coestimulador	CD28	4-1BB	4-1BB
Dosis CAR-T	2×10^6 /kg	Mediana $3,1 \times 10^8$ /kg	DL1: 5×10^7 /kg, DL2: 1×10^8 /kg, DL3: $1,5 \times 10^8$ /kg
Régimen linfodepleción	FLU 30 mg/m ² Cy 500 mg/m ² \times 3 días	FLU 25 mg/m ² Cy 250 mg/m ² \times 3 días	FLU 30 mg/m ² Cy 300 mg/m ² \times 3 días
TRG (RC)%	83 (58)	54 (40)	73 (53) Total 80 (59) Core
TRG a 6 meses (RC), %	41 (36)	33 (29)	60,4
Mediana DR, meses	11,1	No alcanzada	No alcanzada
SG a 12 meses, %	59	49	54,7
SG a 18 meses, %	53	43	No alcanzada
SLP a 12 meses, %	44	66	44,1
SLP a 18 meses, %	40	64	No alcanzada
SLC grado ≥ 3 , %	13	23	2
ICANS grado ≥ 3 , %	31	11	10
Infecciones grado ≥ 3 , %	25	22	12

TRG: tasa de respuesta global; DR: duración de la respuesta; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; SLC: síndrome de liberación de citocinas; ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras.

Resultados de CAR-T en LDCGB y LLA-B R/R aprobados fuera de ensayo clínico

Hasta la fecha no hay datos publicados sobre la aplicación comercial de kymriah, pero se han presentado los resultados preliminares del registro CIBMTR tanto en LDCGB R/R como en LLA-B R/R con tasas de respuesta y toxicidad similares a los ensayos JULIET y ELIANA.

Los datos publicados sobre la aplicación comercial de yescarta en LDCGB R/R sugieren que muchos pacientes que no habrían cumplido los criterios de elegibilidad para el ensayo clínico ZUMA-1, presentarían tasas de respuesta y toxicidad similares.

Con kymriah

En LLA-B R/R

Grupp *et al*⁵⁴ presentaron en ASH 2019 el estudio del registro CIBMTR, en el que 40 centros aportaron datos. De 159 pacientes con LLA-B R/R candidatos a recibir kymriah, se analizaron 105, con una mediana de seguimiento de 5,8 meses. Concluyeron que las características de fabricación, incluido el porcentaje de viabilidad celular, no se correlaciona con las tasas de respuesta, SLC o ICANS (**Tabla 3**).

Tabla 3. Eficacia y seguridad de kymriah en ELIANA vs comercial

	CIBMTR (N=105)	ELIANA (N=75)
TRG (RC), %	88	81
SLP a 6 meses, %	68	73
SG a 6 meses, %	94	90
SLC grado ≥3, %	13,3	46
ICANS %	8,6	13

TRG: tasa de respuesta global; RC: respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión; SLC: síndrome de liberación de citocinas; ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras.

En LDCGB R/R

Jaglowski *et al*^{32,33} presentaron en ASH 2019 el estudio del registro CIBMTR, en el que 26 centros aportaron datos. De los 70 pacientes con LDCGB R/R candidatos a recibir kymriah, se analizaron 47, con una mediana de edad de 67 años (36-88), y 23% auto-TPH previo. La mediana de seguimiento fue de 5,8 meses. Concluyeron que las características de fabricación, incluido el porcentaje de viabilidad celular, no se correlacionaron con las TRG, SLC o ICANS (**Tabla 4**).

Tabla 4. Eficacia y seguridad de kymriah en JULIET vs comercial

	CIBMTR (N=47)	JULIET (N=115)
TRG, %	59,6	54
RC, %	38,3	40
SLC grado ≥3, %	4,3	23
ICANS grado ≥3	4,3	11

TRG: tasa de respuesta global; RC: respuesta completa; SLC: síndrome de liberación de citocinas; ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras.

Con yescarta en LDCGB R/R

El primer estudio fue presentado por Nastoupil en ASH 2018³⁵. De 295 pacientes con LDCGB R/R candidatos a recibir yescarta, se evaluaron 274, con una mediana de edad de 60 (21-83), 19% ECOG 2-3, 83% estadio III/IV, 75% con 3 o más líneas, 33% auto-TPH, 1% alo-TPH previo y 3% afectación del SNC. El tiempo medio de fabricación del CAR-T fue de 21,5 días y el 55% recibió terapia puente para controlar enfermedad.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

El segundo estudio fue presentado por Jacobson en ASH 2018³⁶. De los 108 pacientes infundidos con LDCGB R/R, se evaluaron 104, con una mediana de edad de 63,8 años, 27% auto-TPH previo y 3% alo-TPH previo. El 52% recibió terapia puente para controlar la enfermedad (**Tabla 5**).

Tabla 5. Eficacia y seguridad de yescarta en ZUMA-1 vs comercial			
	ZUMA-1 (N=101)	Nastoupil (N=274)	Jacobson (N=104)
TRG, %	82	81	71
RC, %	58	57	44
SLC grado ≥3, %	13	7	16
ICANS grado ≥3	31	33	39

TRG: tasa de respuesta global; RC: respuesta completa; SLC: síndrome de liberación de citocinas; ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras.

Experiencia en Inglaterra con CAR-T comercial en pacientes con LDCGB R/R

El servicio nacional de salud en Inglaterra ha implementado con éxito una estructura nacional para proporcionar productos CAR-T con igualdad de acceso. Kuhn et al⁴⁰ presentaron en ASH 2019 la experiencia comercial prospectiva y centralizada con kymriah y yescarta en pacientes con LDCGB R/R.

De 91 pacientes, se evaluaron 80, 56 recibieron yescarta y 24 kymriah. La mediana de edad fue de 56, el 71% tenían LDCGB, 24% linfoma transformado de linfoma folicular y de zona marginal y 5% LPMB. El 4% alo-TPH previo y 15 % auto-TPH previo. El 84% recibieron terapia puente entre el momento de la aprobación y la infusión de CAR-T (mediana de 64 días), 62 recibieron quimioterapia, 9 radioterapia y 17 esteroides solamente, obteniendo tasas similares de respuesta y toxicidad similares a los ensayos JULIET y ELIANA.

Ensayos pivotaes en pacientes adultos con LDCGB-B R/R tras 1ª línea

Disponemos de ensayos clínicos fase III, en reclutamiento, para comparar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de kymriah (BELINDA³⁷), yescarta (ZUMA-7³⁹) y lisocabtagene (TRANSFORM³⁸) tras quimioterapia puente y linfodepleción *versus* tratamiento estándar de segunda línea con quimioterapia basada en platino seguida de auto-TPH en pacientes con LNH-B agresivo en primera recaída dentro de los 12 meses tras la última dosis de rituximab y antraciclina o refractarios (aquellos que no alcanzan RC o RP) (Figuras 2 a 4).

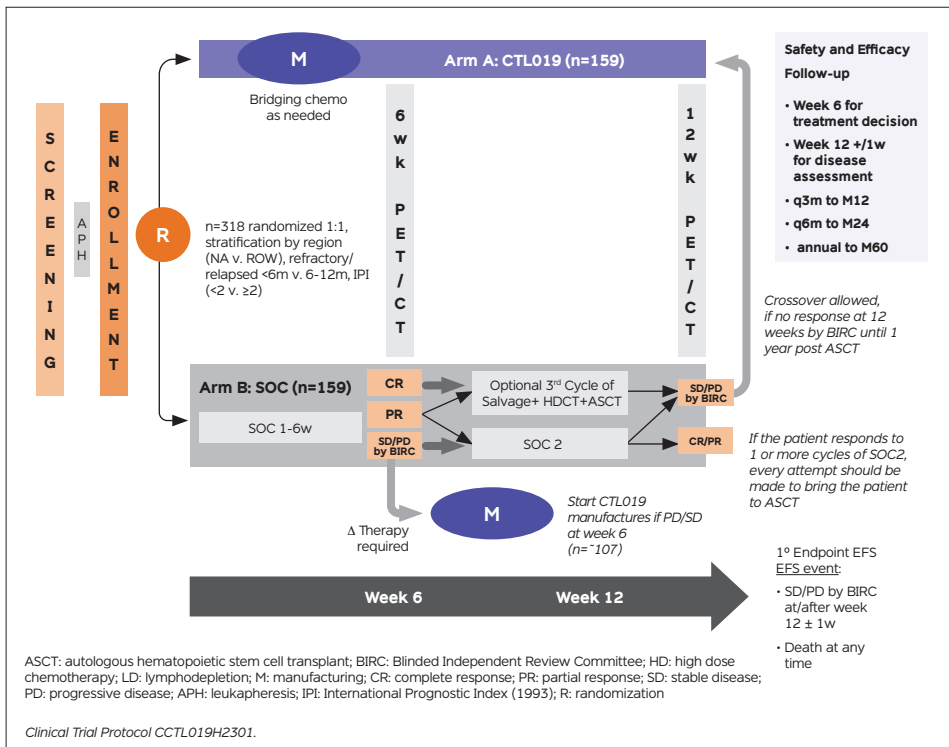


Figura 2. Diseño del estudio BELINDA (CCTL019H2301). Promotor: Novartis.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

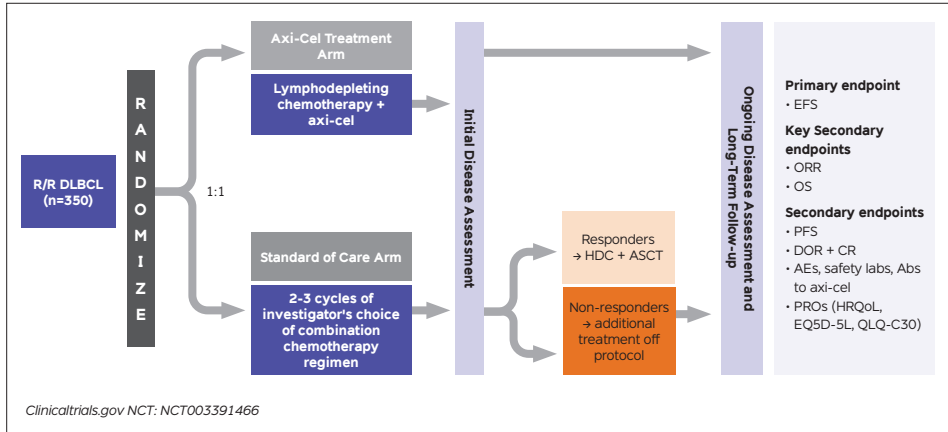


Figura 3. Diseño del estudio ZUMA-7 (NCT03391466). Promotor: Kite.

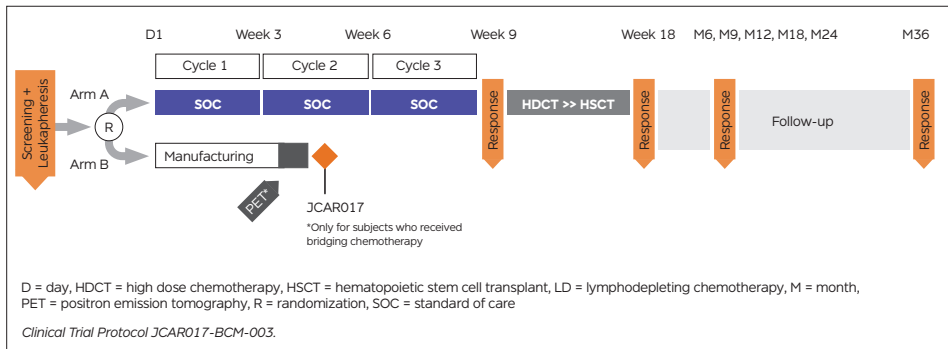


Figura 4. Diseño del estudio TRANSFORM (JCAR019BCM003). Promotor: Celgene.

Conclusiones

- El uso de CAR-T (kymriah) en niños y adultos jóvenes con LLA-B R/R permite alcanzar TRG del 82% con una mediana de SG de 19,1 meses, con un perfil de seguridad aceptable, por lo que supone una oportunidad de tratamiento para estos pacientes. Estos datos están siendo reproducidos con el CAR-T comercial.
- El uso de kymriah dentro de ensayo clínico JULIET para LDCGB R/R permite alcanzar TRG del 54% y SG a 18 meses del 43%, con una mediana de seguimiento de 24 meses. Tiene un perfil de seguridad aceptable, presenta más síndrome de liberación de citocinas respecto al resto de productos (23% SLC de grado ≥ 3) siendo reversible con el tiempo. Estos datos están siendo reproducidos con el CAR-T comercial.
- El uso de yescarta dentro del ensayo clínico ZUMA-1 para LDCGB R/R permite alcanzar TRG del 83% y SG a 18 meses del 53%, con una mediana de seguimiento de 27,1 meses. Su perfil de seguridad es aceptable, presenta más neurotoxicidad respecto al resto de productos (31% ICANS de grado ≥ 3) siendo reversible con el tiempo. Estos datos han sido reproducidos con el CAR-T comercial, incluso en pacientes que no habrían cumplido los criterios de elegibilidad de ZUMA-1.
- El uso de lisocabtagene (pendiente de aprobación) dentro del ensayo clínico TRANSCEND (el de mayor N reportado hasta la fecha) para LDCGB R/R permite alcanzar TRG del 73% y SG a 12 meses del 54,7%, con una mediana de seguimiento de 12 meses. Su perfil de seguridad es aceptable, ocurriendo la toxicidad en menor porcentaje y más tarde respecto a los otros productos CAR-T, apoyando el tratamiento con lisocabtagene en el ámbito ambulatorio.
- Por todo ello se está explorando la introducción de la terapia CAR-T en fases tempranas de la enfermedad, con el fin de optimizar la respuesta en este grupo de pacientes.

Bibliografía

1. Kymriah-epar-product-information. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/kymriah-epar-product-information>. Acceso Noviembre 26, 2018.
2. Yescarta-epar-product-information. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/yescarta-epar-product-information>. Acceso Noviembre 26, 2018.
3. Abramson JS, Palomba ML, et al. High durable CR rates in relapsed/refractory (R/R) aggressive B-NHL treated with the CD19-directed CAR T cell product JCAR017 (TRANSCEND NHL 001): defined composition allows for dose-finding and definition of pivotal Cohort. *Blood*. 2017;130(Suppl. 1):581.
4. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med*. 2015; 373:1541-52.
5. Brudno JN, Somerville RP, et al. Allogeneic T cells that express an Anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-Cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *J Clin Oncol*. 2016;34:1112-21.
6. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2016; 375:740-53.
7. Inotuzumab ozogamicina -product-information. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu>
8. Blinatumomab-product-information. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu>
9. Lee DW, Kochenderfer JN, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385:517-28.
10. Lee DW, Stetler-Stevenson M, et al. Long-Term Outcomes Following CD19 CAR T Cell Therapy for B-ALL Are Superior in Patients Receiving a Fludarabine/Cyclophosphamide Preparative Regimen and Post- CAR Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: American Society of Hematology: *Blood*. 2016. p. 218.
11. Grupp S, Maude S, et al. Durable Remission in Children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19 - Targeted Chimeric Antigen Receptor (CTL019). In: American Society of Hematology: *Blood*, 2015. p. 681.
12. Grupp SA, Laetsch TW, Buechner J, et al. Analysis of a global registration trial of the efficacy and safety of CTL019 in pediatric and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2016;128:221.
13. Maude SL, Laetsch T.W, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-48.
14. Park JH, Riviere I, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378:449-59.
15. Laetsch TW, Myers GD, et al. Patient-reported quality of life after tisagenlecleucel infusion in children and young adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a global, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20:1710-8.
16. Protocolo CART19-BE-02. Promotor Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). 2019.
17. A Study Evaluating KTE-X19 in Adult Subjects With Relapsed/Refractory B-precursor ALL (ZUMA-3). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02614066>
18. National Institutes of Health; National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer Stat Facts: Non-Hodgkin Lymphoma. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/stat-facts/html/nhl.html>. Acceso Junio 14, 2019.
19. Cunningham D, Hawkes EA, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 2013;381:1817-26.
20. Vose JM, Anderson JR, et al. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1993;11:1846-51.
21. Gisselbrecht C, Glass B, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28:4184-90.
22. Mounier N, Canals C, Gisselbrecht C, et al, Lymphoma Working Party of European Blood and Marrow Transplantation Registry (EBMT). High-dose therapy and autologous stem cell transplantation in first relapse for diffuse large B cell lymphoma in the rituximab era: an analysis based on data from the European Blood and Marrow Transplantation Registry. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:788-93.
23. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-Cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2017;377:2545-54.
24. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380:45-56.
25. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-Cell therapy in refractory large B-Cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377:2531-44.
26. Abramson J, Palomba ML, Gordon L, et al. High CR rates in relapsed/refractory (R/R) aggressive B-NHL treated with the CD19- directed CAR T cell product JCAR017 (TRANSCEND NHL 001). *Hematol Oncol*. 2017;35:138.

27. Abramson JS, Palomba ML, et al. Pivotal Safety and Efficacy Results From TRANSCEND NHL 001, a Multicenter Phase 1 Study of Iisocabtagene maraleucel (liso-cel) in Relapsed/Refractory (R/R) Large B-Cell Lymphomas. ASH 2019, abstract 241.
28. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Durability of response in ZUMA- 1, the pivotal phase 2 study of axicabtagene ciloleucel (Axi-Cel) in patients (Pts) with refractory large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2018;36:3003.
29. Locke FL, Ghobadi A, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. Lancet Oncol. 2019;20(1):31-42.
30. Donald LP, Annette P, et al. Impact of Liso-cel Treatment on Health-Related Quality of Life and Health Utility in Patients With Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: TRANSCEND NHL 001. ASH 2019, abstract 66.
31. Maloney DG, Abramson JS, et al. Preliminary safety profile of the CD19- directed defined composition CAR T cell product JCAR017 in relapsed/refractory aggressive B-NHL patients: potential for outpatient administration. Blood. 2017;130(Suppl. 1):1552.
32. Riedell PA, Chase W, et al. A Multicenter Retrospective Analysis of Clinical Outcomes, Toxicities, and Patterns of Use in Institutions Utilizing Commercial Axicabtagene Ciloleucel and Tisagenlecleucel for Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas. ASH 2019, abstract 1599.
33. Jaglowski S, Hu ZH, et al. Tisagenlecleucel Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy for Adults with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Real World Experience from the Center for International Blood & Marrow Transplant Research (CIBMTR) cellular therapy Registry. ASH 2019, abstract 766.
34. Grupp S, Hu ZH, et al. Tisagenlecleucel CAR T-cell therapy for children and young adults with r/r ALL: RWE from the CIBMTR registry. ASH 2019, abstract 2619.
35. Nastoupil LJ, Jain MD, et al. Axicabtagene ciloleucel (axi-cel) CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for relapsed/refractory large B-cell lymphoma: real world experience. Blood. 2018;132:91.
36. Jacobson CA, Hunter B, et al. Axicabtagene ciloleucel in the real world: outcomes and predictors of response, resistance and toxicity. Blood. 2018;132:92.
37. Tisagenlecleucel versus standard of care in adult patients with relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma: A randomized, open label, phase III trial (BELINDA). Clinical Trial Protocol CCTL019H2301.
38. A global randomized multicenter phase 3 trial to compare the efficacy and safety of jcar017 to standard of care in adult subjects with high-risk, transplanteligible relapsed or refractory aggressive b-cell non-hodgkin lymphomas (TRANSFORM). Clinical Trial Protocol JCAR017-BCM-003.
39. Efficacy of Axicabtagene Ciloleucel Compared to Standard of Care Therapy in Subjects With Relapsed/Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma (ZUMA-7). Clinical Trial Protocol NCT03391466.
40. Kuhn A, Roddie C, et al. Real-World Data of High-Grade Lymphoma Patients Treated with CD19 CAR-T in England. ASH 2019, abstract 767.

CAPÍTULO 2

Nuevas indicaciones CAR-T

Javier Briones

Servicio de Hematología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Introducción

La inmunoterapia adoptiva con células T modificadas con receptores quiméricos antígeno-específicos (CAR-T) ha revolucionado el campo de la inmunoterapia del cáncer, en especial en las neoplasias hematológicas de células B. Los estudios clínicos con un CAR dirigido al antígeno 19 (CAR19) han mostrado resultados excelentes en pacientes con leucemia aguda linfoblástica B y linfoma no-Hodgkin B en situación de refractariedad o tras múltiples líneas de tratamiento. Estos resultados han promovido el desarrollo de CAR-T para otras neoplasias hematológicas, bien sea utilizando un CAR19 (p.ej. leucemia linfática crónica) o nuevos CAR-T dirigidos contra otros antígenos (p.ej. mieloma múltiple, leucemia aguda mieloide o linfoma de Hodgkin) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Dianas antigénicas para terapia CART en neoplasias hematológicas

Enfermedad	Antígenos
Mieloma	BCMA, cadena Kappa, CD19, TACI ligando, GPRD5C, CD44v6
Leucemia linfática crónica	CD19, CD23, ROR1
Leucemia aguda mieloide	CD33, CD123, CLL1, TIM3, CD70, NKG2DL, CD44v6
Enfermedad de Hodgkin	CD30, CD19, CD123

Desarrollo de CAR-T en mieloma y leucemia linfática crónica: resultados clínicos

Mieloma múltiple

En los últimos años se han desarrollado CAR-T dirigidos frente a diversos antígenos expresados en las células de mieloma: BCMA, CD38, CD138, CD19, GPRD5C o CD44v6. Como en todas las situaciones de inmunoterapia celular, el antígeno ideal es aquel que presenta una alta expresión específicamente en células plasmáticas tumorales, con expresión muy restringida en tejidos normales. Una de las dianas que cumple este requisito es el antígeno de maduración de células B (BCMA).

El BCMA pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y, a través de la unión a ligandos como BLyS/BAFF o APRIL, interviene de forma importante en la regulación de la maduración y diferenciación de las células B¹. La expresión de BCMA aumenta durante la diferenciación a células plasmáticas y se encuentra elevada en la mayoría (60-100%) de los mielomas, mientras que su expresión es mínima o ausente en tejidos normales no hematopoyéticos (**Figura 1**).

El primer estudio de terapia CAR-T-BCMA fue realizado por investigadores del Instituto Nacional de Cáncer (EEUU), en un reducido grupo de pacientes (n=12) con mieloma

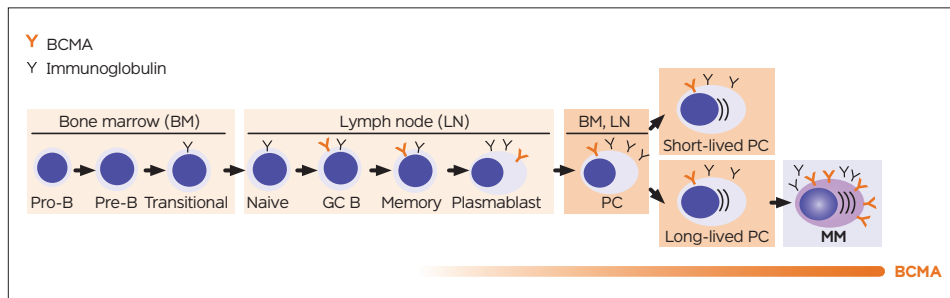


Figura 1. Patrón de expresión de BCMA en células B y diferenciación a célula plasmática (tomado de Cho et al²).

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

múltiple (MM) refractario (mediana de 7 líneas de tratamiento). En este ensayo fase I se obtuvieron respuestas completas (RC) en aquellos casos que recibieron la dosis más alta de CAR-T-BCMA (hasta 9×10^6 células CAR-T/kg)². Estos datos constituyeron la base para el desarrollo de un ensayo con un CAR-T-BCMA de segunda generación (coestimulación 4-1BB) en pacientes con MM refractario, cuyos resultados acaban de ser presentados³. En este estudio se trataron 33 pacientes (21 en la fase I) y 12 en la fase de expansión. La mediana de tratamientos recibidos fue de 7 y más del 90% habían recibido un TASP. La dosis de CAR-T-BCMA osciló entre 50 y 800 millones de células CAR+, administradas tras un acondicionamiento linfodeplecionante que incluyó ciclofosfamida y fludarabina. Un 85% de los pacientes respondieron, con una tasa de respuestas completas (RC) del 45% y una duración de la respuesta de 11 meses. Si bien no se pudo detectar una correlación dosis-respuesta, los pacientes que respondieron fueron los que recibieron al menos 150 millones de células CAR-T+. Aun así, la mayoría de pacientes presentaron progresión del mieloma antes de los 12 meses (**Figura 2**).

El síndrome de liberación de citocinas (SLC) ocurrió en un 76% de pacientes, mayoritariamente grados 1 o 2, y las complicaciones neurológicas ocurrieron en un 42%, prácticamente todos grado 1-2. Estos resultados, en un grupo de pacientes altamente tratados, han estimulado el desarrollo de numerosos ensayos con CAR-T-BCMA, con ciertas diferencias como el uso de vector retroviral *versus* lentiviral o la utilización de un

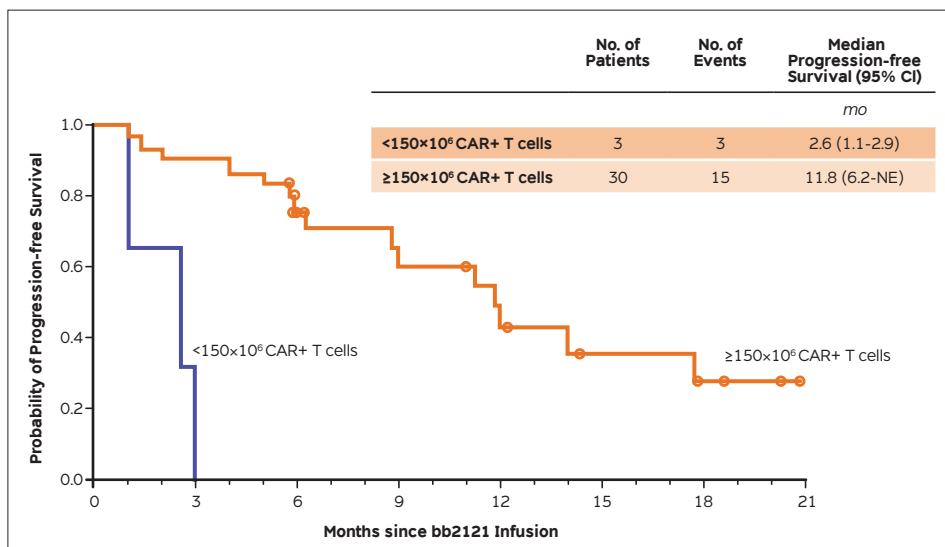


Figura 2. Supervivencia libre de progresión en pacientes con MM que reciben CAR-T-BCMA según dosis (tomado de Raje³).

CAR-T con un anticuerpo anti-BCMA humano (**Tabla 2**). Esta última estrategia tiene el objetivo de evitar la respuesta inmune frente a la región murina, que puede ocurrir en algunos pacientes que reciben un CAR con una secuencia del anticuerpo derivado de ratón. En este sentido, los resultados preliminares de dos ensayos con un CAR-T-BCMA humano (UPenn y bluebirdbio) muestran una tasa de respuestas globales (RG) similar en una población de pacientes con MM similar a la anteriormente descrita (64% y 96%, respectivamente), por lo que está por demostrar si esta estrategia se traduce en resultados clínicamente mejores. En concreto, en el estudio desarrollado en la UPenn⁴, se trataron 25 pacientes (mediana de tratamientos previos de 7), distribuidos en 3 cohortes distintas según la dosis, la cual se administró a su vez repartida en 3 días (10% de la dosis total el día 1, 30% el día 2 y 60% el día 3), en función de la existencia de complicaciones, como SLC. Teniendo en cuenta que con este esquema un 16% de los pacientes solo recibieron las dos dosis más bajas, la tasa global de respuestas fue del 64% con 2 pacientes en RC (una de ellas estricta). La duración mediana de la respuesta y la supervivencia libre de progresión fue de aproximadamente 4 meses, de forma que solo 3 pacientes permanecían sin progresión en el momento de la presentación de los resultados. Es de destacar que, si bien no se han observado recidivas o progresión del mieloma sin expresión del BCMA, las células de MM residuales tras el tratamiento en la mayoría de pacientes mostraban una clara disminución de la expresión del BCMA, hecho que se ha identificado como un factor de resistencia de las células tumorales a la terapia CAR-T-BCMA. En este estudio, la mayoría de los pacientes (88%) tuvieron SLC, que fue grave (grado 3-4) en un tercio de ellos. Se observaron complicaciones neurológicas (ICANS) en 8 pacientes (32%), las cuales fueron graves en 3, incluyendo un paciente con edema cerebral que requirió altas dosis de prednisona.

Tabla 2. Ensayos clínicos con CAR-T-BCMA en MM. Características

Nombre CAR-T	Características constructo	Método modificación celular	Fase de desarrollo
NCI	Murino/CD28	RetroV	I
bb2121	murino/4-1BB	LentiV	I-II
LCAR-B38M	Biepitope/4-1BB	LentiV	I-II
BCMA	Humano/4-1BB Alo/4-1BB	LentiV	Preclin
P-BCMA-ALLO1	4-1BB	Transposón	I
FHCRC	Humano/4-1BB	LentiV	I-II
MSKCC	Humano/4-1BB	RetroV	I-II
UPenn	Humano/4-1BB	LentiV	I-II

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

En resumen, los resultados clínicos de la terapia CAR-T-BCMA en pacientes con MM muestran en general una tasa de respuesta muy alta, pero con una duración relativamente corta, pues la mayoría de los pacientes presentan una progresión de su enfermedad en el primer año postratamiento. Por este motivo se están desarrollando nuevas estrategias con el objetivo de aumentar la eficacia clínica: administración del CAR-T-BCMA conjuntamente con inhibidores de gamma-secretasa, para aumentar la expresión del BCMA en las células tumorales, o el uso de un CAR-T-BCMA en el que el anticuerpo esté dirigido hacia 2 epítopes distintos en la molécula BCMA. En cualquier caso, todas estas estrategias, aunque novedosas y muy interesantes desde el punto de vista biológico, deben validarse en ensayos clínicos adecuados. Así, un estudio preliminar en 57 pacientes tratados con un CAR-T-BCMA con doble especificidad antigénica (LCAR-B38M) mostró una elevada tasa de respuestas (74% RG, 68% RC), si bien solo un 20% de los pacientes que alcanzaron una RC con enfermedad mínima residual negativa (por citometría de flujo) estaban libres de progresión a los 2 años⁵. Este estudio, inicialmente realizado en China, fue continuado en Europa y EEUU en un ensayo fase I/II (CARTITUDE-1) en pacientes con MM refractarios a 3 líneas incluyendo inhibidor de proteosoma, inmunomoduladores y anti-CD38. Recientemente han sido presentados resultados de la fase Ib (n= 29 pacientes); la tasa de respuestas globales fue del 100% con un 69% de RC (la gran mayoría RC estrictas)⁶. Con estos resultados, se ha iniciado la fase II del ensayo, actualmente en periodo de reclutamiento.

Por otra parte, la administración de fármacos inhibidores de gamma-secretasa pre e inmediatamente post-infusión de CAR-T-BCMA podrá aumentar su eficacia al incrementar la expresión del BCMA en la célula tumoral. Estudios preclínicos han demostrado una mayor efectividad de esta combinación⁷, la cual está siendo actualmente probada en ensayos clínicos.

Si bien el BCMA es la diana más utilizada actualmente en la inmunoterapia CAR-T del mieloma múltiple, existen otras dianas para las cuales empiezan a desarrollarse nuevos CAR:

- CS1/SLAMF7 es una molécula expresada en células del sistema inmune (NK, T, B células dendríticas) con funciones activadoras o supresoras según la célula donde se exprese. Es también el ligando del anticuerpo elotuzumab, lo que ha facilitado el diseño de CAR dirigidos hacia CS1/SLAMF7⁸. Esta molécula presenta una alta expresión en prácticamente el 100% de los mielomas múltiples. Estudios preclínicos han demostrado que células CAR-T anti-CS1/SLAMF7 tienen citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* en modelos de mieloma⁹, por lo que podría ser una interesante opción para terapia CAR-T del mieloma, la cual se está estudiando en ensayos clínicos.

- CD138 (sindecán 1) se expresa en células plasmáticas (benigna y tumoral), por lo que es una diana interesante para terapia CAR en MM. Sin embargo, su desarrollo clínico ha sido restringido a un pequeño ensayo en China, con 5 pacientes. La escasa actividad clínica (ninguna respuesta) y el hecho de que CD138 se expresa en múltiples tipos de células epiteliales hacen que esta diana haya perdido actualmente interés para el desarrollo clínico de terapia CAR.

Otros CAR diseñados frente a CD19 y la cadena ligera κ de la inmunoglobulina se han utilizado en estudios piloto, en pacientes con MM, si bien con escasa actividad terapéutica¹⁰.

Recientemente se ha descrito el desarrollo de CAR frente a moléculas novedosas que han suscitado gran interés:

- GPRD5C es una molécula receptor acoplado a proteína G con expresión en MM similar a la de BCMA. Estudios preclínicos recientes han demostrado que un CAR anti-GPRD5C tiene actividad frente a MM en modelos *in vivo*, comparable a la de un CAR-T-BCMA¹¹, por lo que un CARGPRD5C podría ensayarse en pacientes con MM en recidiva tras inmunoterapia con CAR-T-BCMA o cuyos tumores posean una baja expresión de BCMA. Por otra parte, la expresión de GPRD5C es independiente de BCMA en MM, lo que sugiere que el diseño de un CAR biespecífico dirigido simultáneamente a ambos antígenos podría tener relevancia clínica. Es de esperar el inicio de ensayos clínicos con un CAR GPRD5C próximamente en pacientes con MM.
- CD44 es una glicoproteína expresada en numerosos tejidos, incluyendo tumores. Una característica que la hace atractiva para inmunoterapia es su alta heterogeneidad, debida a modificaciones postranscripcionales, incluyendo patrones de glicosilación, los cuales puede tener un comportamiento diferencial en tumores. Así, la isoforma variante 6 de CD44 (CD44v6) se expresa en un alto porcentaje (80%) de MM, mientras que su expresión en tejidos sanos está restringida preferentemente a monocitos y queratinocitos. Recientemente se ha demostrado que un CAR de segunda generación (CD28) dirigido frente a CD44v6 tiene efectividad antitumoral en modelos de mieloma¹². Esto ha llevado al desarrollo de un ensayo clínico de un CARCD44v6 en pacientes con MM refractarios (EureCART) dentro del programa de investigación europeo H2020.
- Por último, merece la pena destacar un nuevo diseño de CAR para MM, que consiste en un CAR con la molécula APRIL, que es un ligando para los receptores BCMA y TACI, ambos expresados en las células plasmáticas de MM. Estudios preclínicos con un CAR-APRIL han mostrado eficacia en modelos de MM¹³, incluyendo aquellos que no expresan BCMA, lo que sugiere que este nuevo diseño podría aumentar la eficacia del CAR-T-BCMA.

Conclusiones

- El BCMA representa actualmente la principal diana para terapia CAR-T, obteniéndose una alta tasa de respuestas en pacientes con MM en recidiva tras múltiples líneas de tratamiento.
- La mayoría de pacientes no tiene respuestas duraderas y la progresión ocurre muy frecuentemente.
- Es necesario explorar nuevas estrategias como utilizar CAR dirigidos hacia nuevas dianas, el desarrollo de CAR biespecíficos dirigidos simultáneamente frente a dos antígenos expresados en MM o la combinación de CAR con agentes inmunomoduladores que incrementen su actividad citotóxica, como lenalidomida.

Leucemia linfática crónica

Si bien los primeros resultados con CART19 en pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) fueron decepcionantes por la ausencia de respuesta clínica^{14,15}, la observación de 3 pacientes con una LLC refractaria y factores de mal pronóstico (deleción p53) que obtuvieron una respuesta completa con una dosis de CART19^{16,17} estimuló el uso de esta terapia en pacientes con LLC. En los primeros estudios, con grupos reducidos de pacientes en los que se utilizó un CART19 de segunda generación coestimulado con CD28, se demostró que la infusión de CART19 podía inducir RC en pacientes con LLC avanzada quimiorrefractarios.

Estudios posteriores con un mayor número de pacientes demostraron el potencial de la terapia CART19 en pacientes con LLC en recidiva y con factores de mal pronóstico. Así, en el estudio de la UPenn¹⁸, se trataron 14 pacientes (CART19-4-1BB) con una mediana de tratamientos previos de 5 y factores de mal pronóstico (43% con deleción de p53), si bien solo un paciente había recibido tratamiento previo con ibrutinib. Un 57% de los pacientes respondieron y el 29% obtuvo una RC. Es de destacar que ninguno de los pacientes con RC progresó, tras un seguimiento mediano de 18 meses y en ninguno de ellos se detectó la presencia clonal de células B por técnicas de secuenciación de última generación (enfermedad mínima residual -EMR- negativa). La expansión de las células CAR-T y la presencia de aplasia de células B (como marcador de la funcionalidad del CAR-T) fueron factores asociados claramente a respuesta.

La eficacia de un CART19 en pacientes con LLC tratados con fármacos actuales (es decir, inhibidores de BTK o venetoclax) se estudió en un ensayo realizado en el Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle)¹⁹. En este ensayo se trataron 24 pacientes, todos ellos en recidiva o refractarios a ibrutinib, 6 de ellos también en recidiva tras venetoclax. Todos los pacientes recibieron productos CART19 de segunda generación (coestimulación 4-1BB) obtenidos (linfoaféresis) en ausencia de exposición a ibrutinib, tras una quimioterapia linfodepletiva con ciclofosfamida y fludarabina. La tasa de respuestas globales fue del 74%, y un 21% obtuvo una RC, de los cuales 58% fue con enfermedad mínima residual (EMR) negativa por secuenciación. Similar a lo descrito en estudios previos, los pacientes con RC EMR negativa tuvieron un 100% de supervivencia libre de progresión (SLP), mientras que aquellos con RC en los que es posible la detección de clones B, la progresión es la norma (**Figura 3**).

Estudios recientes con un CART19 (coestimulado con 4.1BH) con ajuste de ratios CD4:CD8 (1:1) han mostrado una tasa de RC del 45%, la mayoría de ellos (65-75%) con EMR negativa por secuenciación o citometría²⁰. Actualmente está en marcha la fase II de extensión del mencionado estudio (TRANSCEND 004) que incluye un mayor número de pacientes que recibirán la dosis máxima tolerada establecida en la primera fase.

Los resultados obtenidos hasta la fecha muestran que solo un reducido grupo de pacientes (aquellos que obtiene una RC con EMR negativa) se benefician de la terapia CART19. Por este motivo, se están desarrollando estudios para analizar las causas de

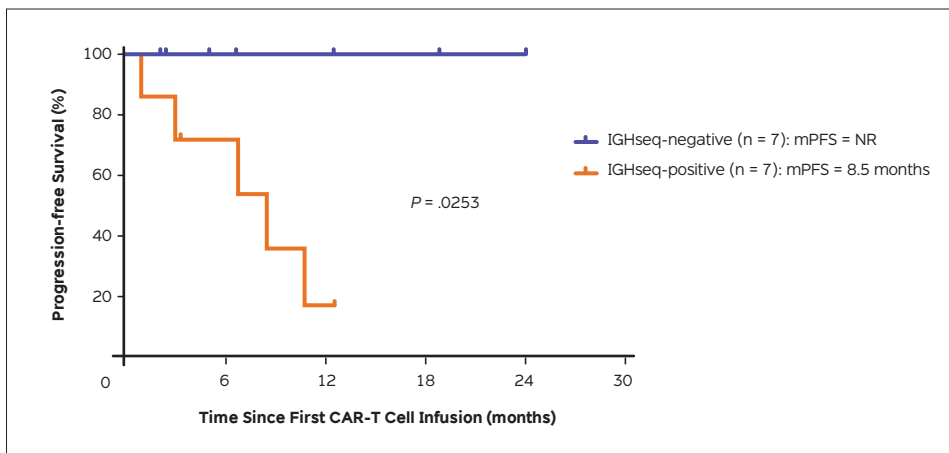


Figura 3. Supervivencia libre de progresión en pacientes con LLC que obtienen RC tras CART19 en función de la presencia de clones B por secuenciación (tomado de Turtle *et al*¹⁹).

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

refractoriedad de la LLC a esta terapia y que estrategias podrían aumentar su eficacia. En relación con la disfunción celular T inducida por las células de LLC, estudios recientes han mostrado que uno de los factores involucrados podría ser una deficiente activación y coestimulación de las células CAR-T²¹. En este sentido, estrategias dirigidas a aumentar la coestimulación de las células T, como la transducción con CAR19 que incluya una secuencia del ligando 4-1BB, podría incrementar la eficacia. Esta opción está siendo estudiada en ensayos clínicos en pacientes con neoplasias linfoides B, incluyendo LLC. Por otra parte, se ha observado que la composición celular del producto de partida para la producción del CAR19 está asociada a la calidad de la respuesta. Así, los pacientes que obtuvieron RC mantenida fueron aquellos que presentaban una mayor proporción de células T de memoria (compatibles con el subtipo memoria *stem*) en el producto de linfoaféresis²².

Estudios recientes han mostrado que el ibrutinib mejora la expansión *in vivo* de las células CART19 en pacientes con LLC, y en estudios preclínicos aumenta su capacidad de implante y efecto antitumoral²³, lo que sugiere que su administración a pacientes con LLC por un periodo de tiempo que incluya tanto la obtención de las células T para la producción de CAR-T como tras su infusión, podría mejorar su eficacia. Este concepto fue analizado en un ensayo reciente en pacientes con LLC tratados con dosis elevadas de un CART19 (coestimulación CD28: dosis hasta $3 \times 10^7/\text{kg}$ CAR-T⁺) algunos de los cuales recibieron ibrutinib durante la linfoaféresis y tras la infusión del CAR-T²⁴. Los resultados preliminares sugieren que los pacientes con exposición a ibrutinib en el momento de la linfoaféresis muestran una mayor expansión *in vivo* del CART19, pero solo un 25% del total de pacientes obtuvieron una RC. Por ello, el impacto clínico del uso de ibrutinib por un periodo prolongado que incluya la obtención de las células para la producción de CAR-T es actualmente desconocido.

Conclusiones

- La eficacia de CART19 en pacientes con LLC es reducida, con una tasa de RC por lo general inferior al 30%.
- Sin embargo, la mayoría de pacientes en RC obtiene una enfermedad mínima residual negativa, lo que se asocia con una SLP elevada cercana al 100%.
- El uso de ibrutinib previo y durante a la obtención del producto celular para la producción de CAR-T mejora la expansión celular de CAR-T *in vivo*, pero está por demostrar que tenga un impacto relevante en la respuesta clínica del CART19.

Datos preclínicos en leucemia aguda mieloblástica y enfermedad de Hodgkin

Leucemia aguda mieloblástica

Los resultados clínicos obtenidos con CART19 en pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAM) han estimulado la investigación CAR-T para LAM. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en LLA-B, la mayoría de los antígenos diana para inmunoterapia que se encuentran en las células tumorales de LAM también se expresan en tejido hematopoyético sano, lo que constituye una dificultad añadida. El antígeno ideal para inmunoterapia es aquel expresado en las células denominadas *stem* de la leucemia mientras que muestran una ausencia o expresión reducida en células normales hematopoyéticas.

Estudios preclínicos iniciales han diseñado y analizado CAR dirigidos contra antígenos como CD33 y CD123, los cuales se encuentran en la mayoría de los pacientes con LAM, pero también en células mieloides sanas, lo que podría comprometer la seguridad de la terapia CAR-T. El CD123 se expresa en una amplia mayoría de LAM y ha sido evaluado para terapia CAR-T. Este antígeno ejemplifica el concepto de la importancia del diseño del CAR-T no solo en cuanto a eficacia sino también a seguridad. Así, en estudios preclínicos se ha observado un efecto diferente del CAR123 en poblaciones mieloides tumorales *versus* sanas. Mientras que un CART123 coestimulado con CD28 no tenía un efecto reconocido en progenitores mieloides normales²⁵, el CART123 coestimulado por 4-1BB era capaz de eliminar no sólo los blastos sino también las células mieloides sanas²⁶, lo que representa un serio obstáculo para su uso en pacientes, puesto que esta molécula, al igual que CD33 se expresa también en tejidos sanos (por ejemplo, piel, pulmón y próstata).

Por esta razón se ha iniciado la búsqueda de dianas antigénicas con expresión predominante en la célula leucémica *stem* comparado con su expresión en progenitores normales.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

En este sentido, un amplio estudio basado en transcriptómica y proteómica de poblaciones celulares *stem*, progenitores multipotentes y otras células mieloides más diferenciadas han identificado una serie de antígenos candidatos para terapia CAR-T de LAM²⁷. Estas dianas poseen una expresión diferencial entre células neoplásicas y normales y están presentes en una gran mayoría de las LAM. Además se realizó un estudio de expresión de las moléculas candidatas en células T, como CD96, altamente expresada en LAM pero también en células T, lo que podría dificultar la generación de un producto celular CAR-T. Algunas de ellas incluyen CD70, CCR1, CLL1, o CD44v6 o ligandos de NKG2D las cuales están siendo investigadas en ensayos clínicos preliminares^{28,29}.

Otra molécula diana para CAR-T de LAM es FLT3, la cual está expresada en una proporción de LAM. Estudios preclínicos han demostrado el potencial de un CAR-T anti-FLT3 para eliminar células leucémicas³⁰; sin embargo FLT3 también está ampliamente expresado en progenitores hematopoyéticos normales, lo cual limita seriamente su uso clínico.

Conclusiones

- La terapia CAR-T contra LAM requiere la identificación de dianas antigénicas relevantes, lo cual está dificultado por la expresión simultánea en progenitores hematopoyéticos normales.
- Algunas moléculas potencialmente relevantes son CD70, CLL1, TIM3, CD44v6 o NKG2DL.n Se han iniciado ensayos clínicos con CAR-T dirigidos frente a moléculas como CD123, CD33, CD70, NKG2DL y CD44v6 en pacientes con LAM.

Enfermedad de Hodgkin

La molécula CD30 se expresa en todos los casos de enfermedad de Hodgkin clásica (EHc), con una expresión tumoral alta y uniforme. Sin embargo, la expresión de CD30 en células normales está muy restringida (eosinófilos y células T y B solo cuando están activadas). Por este motivo, CD30 es una diana terapéutica ideal para inmunoterapia con células CAR-T.

Hasta la fecha se han completado dos ensayos clínicos con un CART30 en pacientes con EHc, los cuales han mostrado una tasa moderada de respuestas^{31,32}. En un grupo

de 17 pacientes refractarios, con una mediana de líneas de tratamiento previas de 3, tratados con células CART30 (coestimulado con 4-1BB) la tasa de respuestas fue de un 39% (todas RP). En el segundo ensayo con 7 pacientes, con 4 tratamientos previos (mediana), tratados con células CART30 (coestimulado con CD28) se obtuvieron un 33% de RC. Es de destacar que en este último ensayo no se administró tratamiento linfodeplecionante a los pacientes previo a la infusión de las células CAR-T. Sin embargo, en la fase de extensión de este último ensayo, en el que los pacientes recibieron acondicionamiento linfodeplecionante con fludarabina y bendamustina o ciclofosfamida, se detectó un incremento de la eficacia de la administración de células CART30, obteniéndose una tasa global de respuestas del 78% con un 67% de RC y una mayor persistencia de las células CART30 en sangre periférica³³, lo que sugiere que la eficacia del tratamiento con células CART30 puede incrementarse con un tratamiento linfodeplecionante previo a la infusión, tal y como se realiza actualmente con pacientes con neoplasias linfoides B que reciben terapia con células CART19. A pesar de la mejoría en las respuestas, es necesario desarrollar nuevos diseños de CART30 que confieran mayor persistencia de las células CAR-T, incremento del tráfico de dichas células al tumor y resistencia al ambiente tumoral inmunosupresor.

Algunas de estas estrategias están siendo investigadas en el contexto preclínico. Así, algunos investigadores han desarrollado un CART30 que coexpresa la molécula CCR4 para aumentar la atracción al interior del tumor, dado que éste secreta la molécula TARC, que se une a CCR4. Estudios en modelos animales de Hodgkin han mostrado una mayor eficacia antitumoral comparado con el CART30 sin CCR4, debido, en parte, a una mayor infiltración de las células CAR-T en el tumor³⁴. Estos estudios forman la base para el inicio de un ensayo clínico con este diseño de CART30-CCR4 en pacientes con EHC refractarios o en recidiva.

Nuestro grupo de inmunoterapia génica en el Servicio de Hematología ha desarrollado un nuevo CART30 (HSP-CAR30) con atributos diferentes de los anteriores, que le confieren una alta eficacia antitumoral en modelos de Hodgkin experimentales: especificidad antigénica resistente al bloqueo por CD30 soluble, redirección frente a un epítipo de la molécula CD30 que confiere alta citotoxicidad tumoral. Además, nuestro producto HSP-CAR30 está enriquecido en células T de memoria, central y *stem*³⁵, lo cual puede incrementar el efecto antitumoral.

En estudios de eficacia *in vitro* HSP-CAR30 induce una citotoxicidad específica del 80-100% de líneas celulares de Hodgkin clásico, comparado con células T control.

El efecto antitumoral *in vivo* de las células HSP-CAR30 se estudió en 2 modelos xenogénicos NOD/SCID γ (NSG) con líneas tumorales humanas de linfoma de Hodgkin. La

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

administración de una dosis única de células HSP-CAR30 vía ev. en ratones con tumor implantado produce la eliminación del tumor en el 100% con supervivencia del 100% al final del estudio, mientras que el grupo control presentó una supervivencia del 0% por crecimiento tumoral. Además, las células HSP-CAR30 mostraron una gran persistencia en el tiempo, con redistribución mayoritaria en órganos linfoides, y fueron capaces de eliminar una nueva administración de tumor en el 100% de los casos. Nuestros datos demuestran que HSP-CAR30 son capaces de generar inmunidad anti-Hodgkin específica a largo plazo y de eliminar de forma muy eficaz tumores con diseminación sistémica en órganos linfoides y también en lesiones extranodales. Estos datos preclínicos forman la base para un ensayo clínico en el Hospital de Sant Pau con células HSP-CAR30 en pacientes con EHc en recidiva o refractario a inmunoterapia, incluyendo brentuximab y anticuerpos anti-PD1 (EudraCT 2019-001263-70).

Si bien CD30 es una diana ideal para CAR-T en la enfermedad de Hodgkin, se están estudiando otras que puedan complementar e incrementar eficacia de la terapia CAR-T. Investigadores de UPenn han diseñado un CAR dirigido frente a CD123, molécula expresada en una fracción (alrededor del 60%) de EHc. En estudios preclínicos han mostrado que CART123 es citotóxico de forma específica contra líneas celulares de Hodgkin que expresan CD123 y, más importante, la administración de CAR123 es capaz de erradicar el linfoma de Hodgkin en modelos *in vivo*. Un hallazgo adicional interesante es el efecto citotóxico de dicho CAR-T sobre la población de macrófagos inmunosupresores, que también expresan CD123, lo que podría contribuir a su efecto antitumoral³⁶.

Conclusiones

- La molécula CD30 es la diana más utilizada para terapia CAR-T contra la enfermedad de Hodgkin clásica.
- El CART30 de segunda generación coestimulado con CD28 o 4-1BB es citotóxico frente a células de Hodgkin y muestra actividad eficaz en modelos *in vivo*.
- Se han estudiado varias estrategias para incrementar su efecto antitumoral, que incluyen CAR30 con receptores de quimiocinas, o uso de células T de memoria con alta capacidad de migración tumoral y citotoxicidad.
- La molécula CD123 es otra diana para terapia CAR-T en EHc, que además se expresa en células mieloides supresoras.

Bibliografía

1. Cho SF, Anderson KC, Tai YT. Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;10:9:1821-36.
2. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016;128(13):1688-70.
3. Rajee N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri Dr JN, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2019;380(18):1726-37.
4. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 2019;129(6):130-42.
5. Xu J, Chen LJ, Yang SS, Sun Y, Wu W, Lui Y, et al. Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(19):9543-51.
6. Madduri D, Usmani SZ, Jagannath S, et al. Results from CARTITUDE-1: A Phase 1b/2 Study of JNJ-4528, a CAR-T cell therapy directed against B-Cell Maturation Antigen (BCMA), in patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma (R/R MM). *Blood.* 2019;134(Suppl_1): 577.
7. Pont MJ, Hill T, Cole GO, Abbott J, Kelliher J, Salter A, et al. γ -Secretase inhibition increases efficacy of BCMA-specific chimeric antigen receptor T cells in multiple myeloma. *Blood.* 2019;134(19):1585-97.
8. Chu J, He S, Deng Y, Zhang J, Peng Y, Hughes T, et al. Genetic modification of T cells redirected toward CS1 enhances eradication of myeloma cells. *Clin Cancer Res.* 2014;20(15):3989-400.
9. 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.* 2017;130(26):2838-84.
10. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 2019;129(6):2210-21.
11. Smith EL, Harrington K, Staehr M, Masakayan R, Jones J, Long TJ, et al. GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2019;11(485):pii: eaau7746.
12. Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, Camisa B, Norelli M, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood.* 2013;122(20):3461-72.
13. Lee L, Draper B, Chaplin N, Philip B, Chin M, Galas-Filipowicz D, et al. An APRIL-based chimeric antigen receptor for dual targeting of BCMA and TACI in multiple myeloma. *Blood.* 2018;131(7):746-58.
14. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood.* 2011;118(18):4817-28.
15. Dunbar C. Blood's 70th anniversary: CARs on the Blood highway. *Blood.* 2016;128(1):1-3.
16. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(8):725-33.
17. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011;3(95):95ra73.
18. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7(303):303ra139.
19. Turtle C, Hay K, Hanafi L, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *J Clin Oncol.* 2017;35(26):3010-20.
20. Siddiqi T, Soumerai J, Dorritie K, Stephens D, Riedel P, Arnsason J, et al. Rapid undetectable MRD (uMRD) responses in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma treated with lisocabtagene maraleucel (liso-cel), a CD19-directed CAR T cell product: updated results from TYRasc3nd CLL 004, a phase 1/2 study including patients with high-risk disease previously treated with ibrutinib. 61st American Society of Hematology Annual Meeting. 2019.
21. Collins M, Kong W, Jung I, Wang M, Lundh S, June C. A failure to start: aborted activation of CART cells in chronic lymphocytic leukemia. 61st American Society of Hematology Annual Meeting. 2019.
22. Fraietta J, Lacey S, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 2018;24(5):563-71.
23. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood.* 2016;127(9):1117-22.
24. Geyer M, Riviere I, Sénéchal B, Wang X, Wang Y, Purdon TJ, et al. Safety and tolerability of condi-

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

- tioning chemotherapy followed by CD19-targeted CAR T cells for relapsed/refractory CLL. *JCI Insight*. 2019;5:pii: 122627.
25. Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, Brown CE, Wang X, Budde LE, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(18):3138-48.
 26. Gill S, Tasian SK, Ruella M, Shestova O, Li Y, Porter DL, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood*. 2014;123(15):2343-54.
 27. Perna F, Berman SH, Soni RK, Mansilla-Soto J, Eyquem J, Hamieh M, et al. Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. *Cancer Cell*. 2017;32(4):506-19.
 28. Sallman D, Brayer J, Poire X, Havelange V, Awada A, Lewalle P, et al. Results from the completed dose-escalation of the hematological arm of the phase I Think study evaluating multiple infusions of NKG2D-based CAR-T cells as standalone therapy in relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic patients syndrome patients. 61st American Society of Hematology Annual Meeting. 2019.
 29. Leivas A, Córdoba L, Valeri, Paula Rio, Primo D, Ballesteros J, et al. NKG2D CAR-expressing lymphocytes targets acute myeloid leukemia cells. 61st American Society of Hematology Annual Meeting. 2019.
 30. Jetani H, Garcia-Cadenas I, Nerretter T, Thomas S, Ryzdek J, Briones J, et al. CAR T-cells targeting FLT3 have potent activity against FLT3-ITD+ AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib. *Leukemia*. 2018;32(5):1168-73.
 31. Ramos CA, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, Gee AP, Mei Z, et al. Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3462-71.
 32. Wang CM, Wu ZQ, Wang Y, Guo YL, Dai HR, Wang XH, et al. Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial. *Clin Cancer Res*. 2017;23(5):1156-66.
 33. Challenges of driving CD30-directed CAR-T cells to the clinic. Grover NS, Savoldo B. *BMC Cancer*. 2019;19(1):203-11.
 34. Di Stasi A, De Angelis B, Rooney C, Zhang L, Mahendravada A, Foster A, et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood*. 2009;113(25):6392-402.
 35. Alvarez-Fernández C, Escribà-García L, Vidal S, Sierra J, Briones J. A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy. *J Transl Med*. 2016;14(1):21-7.
 36. Ruella M, Klichinsky M, Kenderian SS, Shestova O, Ziober A, Kraft DO, et al. Overcoming the immunosuppressive Tumor Microenvironment of Hodgkin Lymphoma Using Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancer Discov*. 2017;10:1154-6.

CAPÍTULO 3

Complicaciones de la terapia celular CAR-T

Julio Delgado y Valentín Ortiz-Maldonado

Servicio de Hematología, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona.

Introducción

El desarrollo de una gran variedad de inmunoterapias contra enfermedades neoplásicas tiene como común denominador la manipulación de distintos elementos del sistema inmune con el objetivo de controlar la enfermedad de base.

Terapias tales como anticuerpos monoclonales, inhibidores de *checkpoint*, anticuerpos bi-específicos u otros fármacos inmunomoduladores, tienen capacidad de alterar la actividad de un complejo sistema inmune con un enorme poder metabólico, citotóxico e inflamatorio, capaz de modular intensamente el contexto homeostático de los individuos incluso en cuestión de horas. Se trata, por lo tanto, de terapias que no están libres de toxicidades, y la terapia con linfocitos T con receptor antigénico quimérico (CAR) no es la excepción.

La presencia de un CAR vinculado a las moléculas coestimuladoras correspondientes (4-1BB/CD28 y CD3)¹ en superficie de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) habilita que el simple reconocimiento del antígeno diana desencadene una respuesta inmune celular T principalmente citotóxica, específicamente dirigida contra la célula portadora del antígeno diana. Por lo tanto, esta toxicidad será recibida tanto por las células diana (efecto *on-target on-tumor*) como por otras células sanas que compartan su expresión (efecto *on-target off-tumor*; p.ej. aplasia de linfocitos B). Esto producirá toxicidades que estarán limitadas a aquellas dianas específicas y a las consecuencias de su eliminación (p.ej. hipogammaglobulinemia, infecciones, etc.).

Paralelamente, aquellos linfocitos T colaboradores (CD4+) que contengan el CAR y que a su vez sean activados por el antígeno diana, desencadenarán una potente respuesta inmune mediada principalmente por la liberación de citocinas. Dichas citocinas actuarán de forma autocrina, paracrina y sistémica, teniendo efectos tanto funcionales como tóxicos a dichos niveles.

Dicha respuesta celular T colaboradora o *helper* (CD4+), junto a su cercana interacción con los macrófagos, buscará promover un contexto inflamatorio que favorezca la respuesta inmune contra el objetivo del CAR-T, ya sea mediante la modulación paracrina y sistémica de los linfocitos CAR-T citotóxicos (CD8+) previamente mencionados, como la modulación de otros actores celulares que normalmente se encuentran involucrados en la respuesta del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, microglía, etc.) y la respuesta inflamatoria sistémica (células endoteliales, hepatocitos, médula ósea, etc.).

Por lo tanto, dicha respuesta celular T colaboradora combinada con la respuesta macrofágica podrá generar una gran variedad de efectos tanto deseados como indeseados (toxicidades) a nivel sistémico, sobre una gran variedad de tejidos (**Tabla 1**). Debido a su prevalencia y gravedad potencial destacan especialmente dos de ellas: el denominado síndrome de liberación de citocinas (SLC) y el síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras (del inglés ICANS). Las citocinas principalmente implicadas en la patogénesis del SLC incluyen a la interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interferón-gamma (IFN- γ), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), y el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Otras citocinas, incluyendo al factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-8 (IL-8) también se elevan durante el SLC^{2,3}.

Tabla 1. Toxicidades paracrinas y sistémicas mediadas principalmente por linfocitos CAR-T colaboradores o *helpers* (CD4+) y macrófagos

Toxicidad	Células implicadas	Filiación
Fiebre	Sistema endotelial hipotalámico	SLC
Hipotensión	Sistema endotelial sistémico	SLC/SFC
Hipoxia	Sistema endotelial pulmonar	SLC/SFC
Insuficiencia renal aguda	Sistema endotelial sistémico	SLC/SFC
Síndrome de fuga capilar	Sistema endotelial sistémico	SLC
Coagulopatía	Sistema endotelial sistémico	SLC
Arritmias	Sistema endotelial cardiaco	SLC
Transaminitis	Hepatocitos	SLC/MAS/SOS
Hiperbilirrubinemia	Hepatocitos	SLC/MAS/SOS
Hiperferritinemia	Hepatocitos	SLC/MAS/SOS
Obstrucción sinusoidal	Sistema endotelial hepático	SOS
Cefalea	Sistema endotelial cerebral	SLC/ICANS
Náuseas/vómitos	SNC	SLC/ICANS
Artralgias	Nociceptores (SNP)	SLC/ICANS
Mialgias	Nociceptores (SNP)	SLC/ICANS
Temblor	Sistema endotelial cerebral/SNC	ICANS
Signos de foco	Sistema endotelial cerebral/SNC	ICANS
Convulsiones	Sistema endotelial cerebral/SNC	ICANS
Edema cerebral	Sistema endotelial cerebral/SNC	ICANS

SLC: síndrome de liberación de citocinas; SFC: síndrome de fuga capilar; ICANS: síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras; MAS: síndrome de activación macrofágica; SOS: síndrome de obstrucción sinusoidal; SNC: sistema nervioso central; SNP: sistema nervioso periférico.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Nuestra capacidad de control de dichas toxicidades potencialmente mortales es vital para incrementar las posibilidades de éxito de dichas terapias inmunomediadas. A continuación, abordaremos estas toxicidades, comenzando por la fisiopatología y el diagnóstico y terminando por el estadiaje y manejo de las mismas.

Fisiopatología de las principales toxicidades mediadas por células CAR-T

Los productos CAR-T anti CD19 actualmente aprobados por la FDA/EMA comparten el dominio de coestimulación principal, denominado CD3z, y difieren en los dominios de coestimulación secundarios, 4-1BB (tisagenlecleucel) o CD28 (axicabtagene-ciclotucel) (ver capítulo 1). La unión del antígeno diana con la scFv del CAR produce la activación para fisiológica de dichos dominios intracelulares de coestimulación, los cuales llevarán a la activación inmune del linfocito T que los contenga, sean estos citotóxicos (CD8+) o colaboradores (CD4+).

Debido a dicha activación y en consonancia con la expansión del CAR-T⁴, se iniciará una cascada de eventos constituidos principalmente por la liberación supra fisiológica de sustancias proinflamatorias y el incremento de la actividad citotóxica dirigida que podrán derivar en el desarrollo de ciertas complicaciones específicas de las células CAR-T, complicaciones que serán englobadas dentro de dos síndromes centrales relacionados entre sí y frecuentemente superpuestos: SLC e ICANS.

Dichos síndromes constituyen dos de las principales complicaciones observadas en todos los productos CAR-T, tanto de los comercializados como los que se encuentran en fase de desarrollo, por lo que forman parte de un “efecto de clase” de esta terapia. A continuación, intentaremos diseccionar brevemente los principales eventos y actores involucrados de forma secuencial, destacando el linfocito CAR-T citotóxico (CD8+), el linfocito CAR-T colaborador (CD4+), el macrófago y la célula endotelial (**Figura 1**).

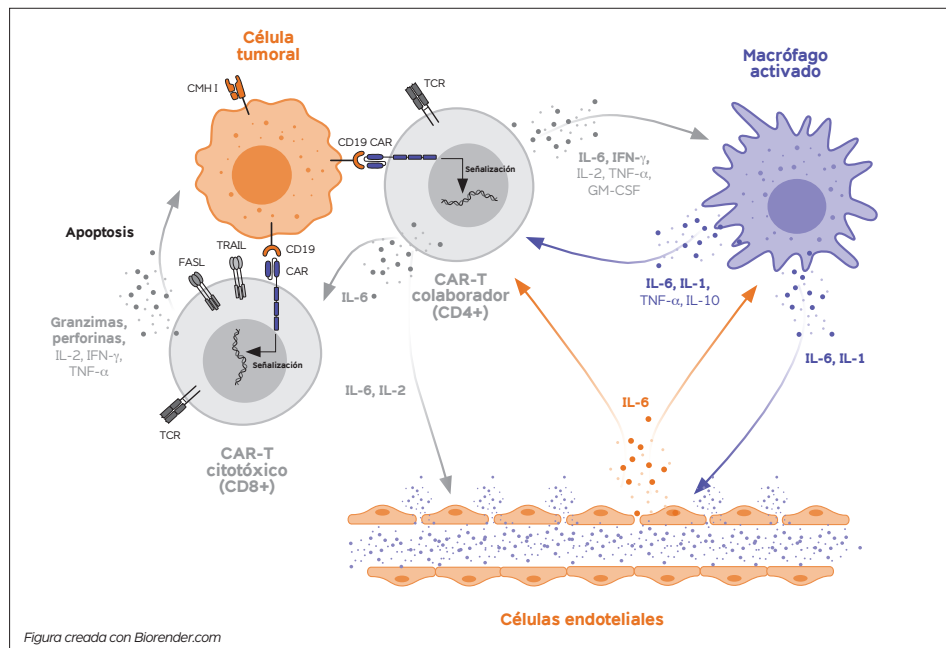


Figura 1. Interacción entre las células CAR-T citotóxico (CD8+) - CAR-T colaborador (CD4+) - célula diana - macrófago - célula endotelial.

El linfocito CAR-T citotóxico (CD8+)

La unión del antígeno diana con el CAR producirá la activación para fisiológica de los subtipos de linfocitos T que lo contengan (**Figura 1**). En el linfocito T citotóxico esto implicará, por un lado, la estimulación de la producción y exocitosis de gránulos citotóxicos sobre la célula diana, gránulos que contienen perforinas y granzimas. Dichas perforinas son proteínas capaces de unirse a la membrana celular de la diana y oligomerizar hasta generar poros que producen la ruptura de la homeostasis celular al permitir una comunicación directa del espacio intracelular con el extracelular. Al mismo tiempo, permiten el ingreso de las granzimas A y B secretadas en los mismos gránulos. Estas son proteasas con capacidad de hidrolizar tanto proteínas intracelulares como extracelulares. A nivel intracelular, hidrolizan proteínas vitales como la nucleolina, nucleofosmina y la topoisomerasa, favoreciendo de esta forma la apoptosis celular vía activación del sistema de caspasas. A nivel extracelular, hidrolizan proteínas como la fibronectina, el colágeno IV, y el factor von Willebrand, debilitando las uniones celulares a nivel endotelial, favoreciendo de esta forma la trans migración de células inmunes, así como la extravasación a los tejidos y la inhibición de la agregación plaquetaria.

Dependiendo de la intensidad de estas reacciones habrá un mayor o menor riesgo de complicaciones tales como el síndrome de lisis tumoral, así como de complicaciones relacionadas con la fuga capilar y complicaciones hemorrágicas.

Finalmente, y de forma secundaria, dichos CAR-T citotóxicos activados también son responsables de la liberación de una serie de citocinas (principalmente IFN- γ y IL-2). Sin embargo, por motivos didácticos estas se mencionarán dentro de las funciones principales del siguiente actor, el linfocito CAR-T colaborador (CD4+).

El linfocito CAR-T colaborador (CD4+)

La unión del antígeno diana con el CAR producirá la activación para fisiológica de los subtipos de linfocitos T que lo contengan (**Figura 1**). En el linfocito T colaborador esto implicará la estimulación de la producción y liberación de una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y factores de permeabilidad vascular cuya función es facilitar la actividad de los linfocitos T citotóxicos, así como de otros elementos del sistema inmune. La activación del CAR-T colaborador estimulará la liberación de citocinas, destacando principalmente IL-6, IL-2, IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF.

IL-6

Citocina de rol pleiotrópico⁵ en la regulación inmune, inflamación y hematopoyesis, entre otras. Cumple, quizás, un rol central en las toxicidades mediadas por las células CAR-T. Su producción no es exclusiva del linfocito T; al contrario, es producida por una gran variedad de células, tanto del sistema inmune (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y microglía) como otras estirpes celulares (endoteliales, neuronas, adipocitos, células musculares y fibroblastos) en respuesta a situaciones de inflamación.

Destaca por ser capaz de mediar señales a distintos tejidos mediante dos vías de gran relevancia (**Figura 2**)⁶, lo cual explica la gran variedad de efectos y toxicidades que puede mediar. Estas dos vías son la vía clásica (mediante su receptor de membrana [IL-6R]) y la vía de transeñalización (mediante su receptor soluble [IL-6Rs]), ambas dependientes de la señalización vía JAK/STAT.

- *La vía clásica:* mediada por la unión directa de la IL-6 con su receptor de superficie de membrana celular, el IL-6R (CD126 o gp80), el cual se encuentra casi exclusivamente en macrófagos, neutrófilos, algunos linfocitos T, hepatocitos y microglía.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

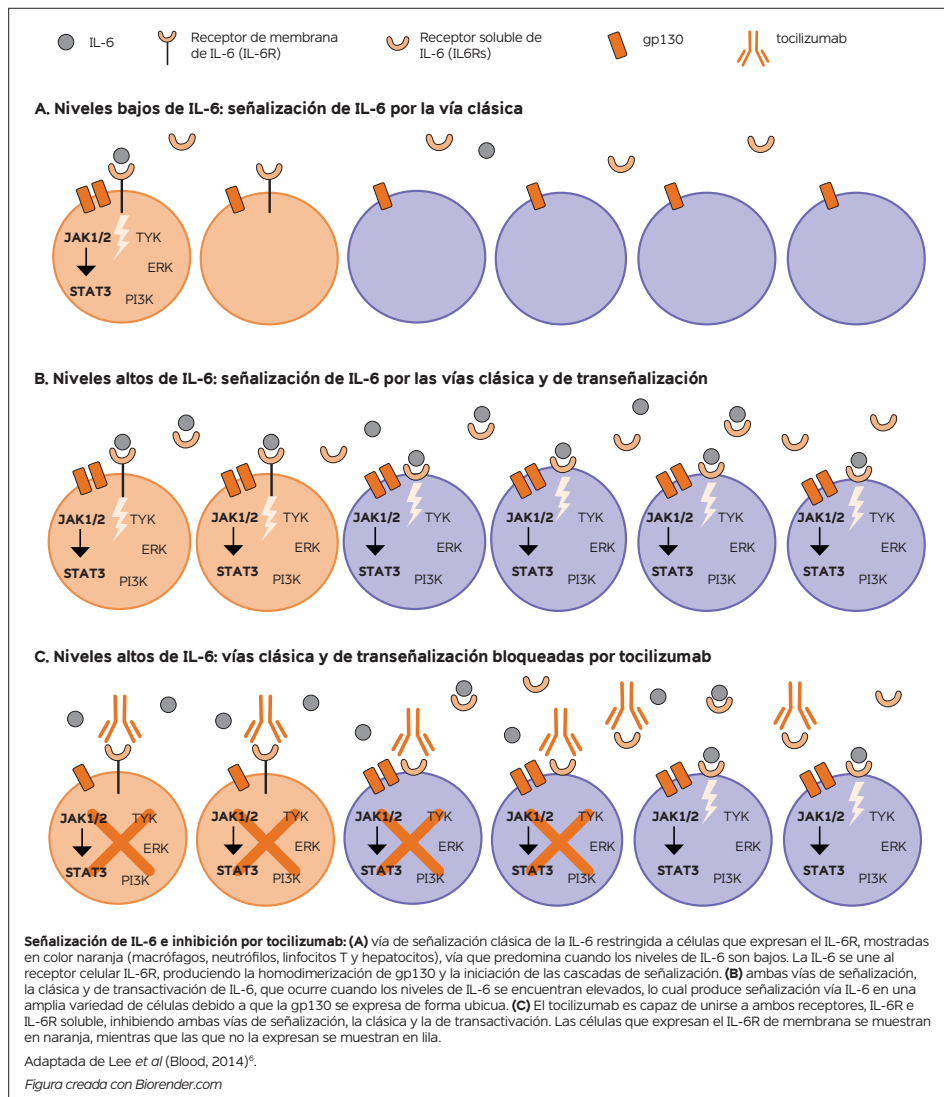


Figura 2. Vías de señalización de la IL-6.

Allí, el complejo IL-6/IL-6R une y homodimeriza a la gp130, que es quien finalmente desencadena la señalización intracelular. Esta vía funciona tanto bajo niveles fisiológicos como de niveles suprafisiológicos de IL-6, y media el efecto de la IL-6 sobre los tejidos mencionados. Es la vía de señalización predominante en presencia de niveles fisiológicos de IL-6, ya que en condiciones fisiológicas los niveles de IL-6Rs son muy bajos, por lo que la IL-6 tiende a unirse predominantemente al IL-6R.

- *La vía de la transeñalización:* mediada por la unión de la IL-6 a la versión soluble del IL-6R (IL-6Rs). Esta vía funciona solamente cuando existen niveles suprafiológicos de IL-6, como sucede durante el SLC y otras situaciones de inflamación. Cuando se produce IL-6 a niveles suprafiológicos, esta comienza a unirse predominantemente a su receptor soluble (IL-6Rs), el cual, a su vez, incrementa sus niveles séricos en respuesta a situaciones de inflamación (originado del clivaje del IL-6R). Esto sucede porque el IL-6Rs se comporta como un reactante de fase aguda, capaz de ser producido tanto por neutrófilos como por hepatocitos. Una vez formado el complejo sérico IL-6/IL-6Rs, este puede unirse virtualmente a cualquier tejido celular que presente en su superficie la gp130 (presente de forma ubicua), y transmitir por el organismo señales intracelulares vía transeñalización de forma generalizada.

El incremento de los niveles de IL-6 actúa entonces en numerosos tejidos, y cumple un rol fundamental en gran parte de los efectos y toxicidades de la terapia CAR-T.

Por ejemplo, a nivel del **sistema nervioso central**, la IL-6 actúa a través de ambas vías de señalización⁷. Si bien el IL-6R y el complejo IL-6/IL-6R no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, la IL-6 libre sí puede. Una vez dentro, la IL-6 puede ejercer sus efectos por ambas vías, tanto directamente sobre la microglía gracias a sus IL-6R como indirectamente por la vía de la transeñalización sobre otras células (neuronas, astrocitos) gracias a la producción local de IL-6Rs por parte de la microglía. Estas vías de señalización participan en el desarrollo del denominado ICANS. Además, actúa como un pirógeno endógeno a nivel del centro termorregulador hipotalámico, favoreciendo el desarrollo de fiebre (SLC).

A nivel del **hepatocito**, la IL-6 actúa tanto por la vía clásica como por transeñalización, donde actúa estimulando la producción de reactantes de fase aguda (RFA). Entre estos RFA se encuentra la proteína C reactiva (PCR), cuya función sería la de activar el sistema de complemento (C1Q) en la superficie de algunas bacterias y células apoptóticas. Además, la IL-6 estimula la ferritina a nivel intracelular, con el objetivo de reducir los niveles séricos de hierro, elemento vital en eventuales infecciones bacterianas. Sin embargo, la rápida y excesiva producción de ferritina provoca su extravasación a la sangre, lo que conduce a la característica hiperferritinemia. Dicha hiperferritinemia puede alcanzar niveles desproporcionados, especialmente en SLC graves, donde los pacientes pueden incluso cumplir con los criterios diagnósticos del denominado síndrome de activación macrofágica (MAS).

A nivel de la **inmunidad innata**, la IL-6 actúa por ambas vías de señalización estimulando tanto a neutrófilos como monocitos/macrófagos (ver más adelante).

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

A nivel del **endotelio vascular**, la IL-6 actúa por la vía de la transestimulación estimulando fenómenos de transmigración, así como favoreciendo las complicaciones derivadas del incremento de la permeabilidad vascular (ver más adelante).

IL-2

Citocina que actúa de forma autocrina y paracrina como factor de crecimiento promoviendo la diferenciación a linfocitos T efectoras y de memoria. Sin embargo, actúa también sistémicamente como un pirógeno endógeno (centro termorregulador del hipotálamo) produciendo fiebre, y es también responsable del desarrollo de síntomas pseudogripales (cefalea, artralgias/mialgias y astenia). También actúa incrementando la permeabilidad vascular, favoreciendo la extravasación de líquido a los tejidos, particularmente a nivel pulmonar.

IFN- γ

Citocina con propiedades antivirales, inmunoregulatorias y antitumorales. Durante el SLC actúa esencialmente sobre el macrófago estimulando su actividad lisosómica y la presentación de antígenos, así como el incremento de su adhesividad al endotelio. Dicha activación provoca que el macrófago incremente la producción de citocinas tales como IL-6, TNF- α e IL-10^{3,8}, las cuales pueden exacerbar aún más el SLC. Es responsable también del desarrollo de síntomas pseudogripales. Es producida también por linfocitos T CD8+ (células T efectoras).

TNF- α

Citocina con propiedades de pirógeno endógeno, es también responsable del desarrollo de fiebre al actuar sobre el centro termorregulador del hipotálamo. Al promover la apoptosis e inhibir la tumorigénesis y replicación viral, destaca por su rol en el característico desarrollo de caquexia que presentan algunos pacientes tratados con terapia CAR-T, inhibiendo también el apetito. Actúa también a nivel macrófágico, estimulando la fagocitosis.

GM-CSF

El factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos es una citocina glicoproteica secretada por macrófagos, linfocitos T, células NK, células endoteliales y fibroblastos. Actúa sobre las células progenitoras hematopoyéticas estimulando la producción de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. También actúa

sobre los neutrófilos incrementando su capacidad de migración, y sobre los macrófagos incrementando su producción de radicales libres de oxígeno.

Macrófago

Estimulado principalmente por el CAR-T CD4+ vía IL-6 e IFN- γ (**Figura 1**) que incrementan su actividad lisosómica y su capacidad de presentación de antígenos, así como su adhesividad al endotelio. Dicha activación produce que el macrófago incremente su producción de citocinas tales como la IL-6, IL-1, TNF- α e IL-10³⁸, las cuales exacerban aún más el SLC. Este mecanismo forma también parte fundamental del desarrollo del SLC. En los casos más graves de SLC, la hiperestimulación macrofágica puede incluso llegar a ser tan intensa que el paciente puede desarrollar un cuadro clínico que cumpla con los criterios diagnósticos de síndrome de activación macrofágica. Dicho cuadro se caracteriza por la elevación de citocinas que, además de las descritas previamente para el SLC, incluye IL-18, IL-8, IP10, MCP1, MIG y MIP1- β , y suelen estar relacionadas con un peor pronóstico⁴. Es, por lo tanto, una manifestación extrema del SLC.

Además de la producción de las citocinas IL-6 y TNF- α , cuyos efectos han sido previamente mencionados, la activación macrofágica destaca por la intensa liberación de IL-1.

IL-1

Citocina producida principalmente por macrófagos, monocitos, fibroblastos y células dendríticas, así como por microglía. Su receptor, el IL-1R, activa la señalización vía MYD88 e IRAK4, y se encuentra presente principalmente en linfocitos T, células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y células progenitoras hematopoyéticas.

A nivel **endotelial**, la IL-1 actúa como un DAMP (*damage-associated molecular pattern*) aumentando la expresión de factores de adhesión celular, favoreciendo la transmigración de células inmunes tales como linfocitos y fagocitos. Aparte, es responsable de causar vasodilatación e hipotensión.

A nivel del **sistema nervioso**, la IL-1 actúa en el centro termorregulador hipotalámico incrementando la temperatura corporal (pirógeno endógeno). Además, actúa favoreciendo hiperalgesia.

A nivel del **sistema inmune adaptativo**, la IL-1 actúa estimulando la respuesta inmune en linfocitos T CD4 y CD8, facilitando la expansión y activación de Th1, Th2, Th17 y linfocitos T CD8 granzima B+.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

A nivel del **sistema inmune innato**, la IL-1 actúa sobre los monocitos circulantes estimulando su producción de IL-6 e IL-1⁹, amplificando la respuesta inflamatoria. Además, actúa como un reclutador de neutrófilos y macrófagos.

A nivel **medular**, la exposición a IL-1 produce una respuesta de “emergencia”, llevando a una afectación de la estirpe mieloide y a la pérdida y daño de células hematopoyéticas, mecanismo que podría estar implicado en el desarrollo de citopenias en pacientes sometidos a la terapia CAR-T.

Célula endotelial

El aumento suprafisiológico de los niveles de IL-1 e IL-2 actúan directamente sobre el endotelio como moléculas DAMP. Por otra parte, el aumento suprafisiológico de los niveles de IL-6 incrementa significativamente la vía de transeñalización IL-6/IL-6Rs a nivel endotelial (**Figura 1**). A su vez, los efectos de la inflamación a nivel endotelial estimulan su propia producción de IL-6, amplificando los niveles sistémicos del mismo.

La activación del endotelio por estas vías produce un cambio en la expresión de quimiocinas hacia un perfil de atracción de monocitos (MCP-1, MCP-2, CXCL5), al mismo tiempo que se incrementa la expresión endotelial de moléculas de adhesión tales como ICAM-1, VCAM-1 y e-selectina, incrementando de esta forma la transmigración leucocitaria (monocitos, linfocitos y neutrófilos), incluyendo en este efecto la barrera hematoencefálica.

Paralelamente, la vía de transeñalización también produce la redistribución de la VE-cadherina, lo cual produce aumento de la permeabilidad vascular¹⁰, la hipotensión, así como la disfunción cardíaca^{11,12}. Según la intensidad y la localización de estos efectos sobre la permeabilidad vascular, esta podrá manifestarse como hipotensión (endotelio sistémico), hipoxia (endotelio pulmonar) o incluso edema cerebral (endotelio del SNC)¹³.

Factores de riesgo de las principales toxicidades mediadas por células CAR-T

De forma conceptual, podría decirse que aquellos factores que favorezcan una mayor activación y expansión *in vivo* de las células CAR-T serán considerados como factores predisponentes del SLC. Una mayor activación y proliferación CAR-T estará necesariamente mediada por una mayor secreción de citocinas. Cuanto más intensa y abrupta sea esta liberación de citocinas mayor será la probabilidad de que la curva de sus niveles sistémicos supere el umbral de homeostasis; por lo tanto, mayor también será la probabilidad de pasar de un SLC subclínico a uno clínico, o de pasar de un SLC clínico leve a uno grave. Por otro lado, cuanto más moderada y paulatina sea esta liberación de citocinas, menor será la probabilidad de que sus niveles sistémicos logren cruzar este umbral.

Podemos distinguir además factores intrínsecos (o dependientes del paciente) y factores extrínsecos (o dependientes del producto y el protocolo de tratamiento) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Factores determinantes del desarrollo de SLC/ICANS

Intrínsecos	Extrínsecos
<ul style="list-style-type: none">- Inflamación basal (tratamientos, EICR, infecciones)- Carga tumoral- Dinámica tumoral	<ul style="list-style-type: none">- Tipo de producto celular- Dosis celular- Fraccionamiento de dosis (SLC)- Protocolos de inmunomodulación

Respecto a los **factores intrínsecos**, un aspecto relevante es el nivel basal de inflamación que existe en el individuo. Existen múltiples situaciones que pueden producir una situación proinflamatoria, haciendo que sea más fácil cruzar el umbral clínico que desencadene un SLC.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Factores tales como tratamientos antineoplásicos recientes que puedan mediar daño endotelial, pacientes sometidos a terapia como el trasplante de progenitores hematopoyéticos, autólogo o alogénico, episodios recientes de enfermedad del injerto contra receptor (EICR), o incluso cualquier proceso infeccioso reciente o en curso pueden añadir un nivel basal de citocinas a las que se le sumarán las producidas por el propio CAR-T.

A su vez, estados proinflamatorios basales podrían exacerbar la actividad del CAR-T. De aquí el peligro de administrar un CAR-T en situaciones de infección sistémica activa o situaciones de EICR activos. Por lo tanto, la cantidad de citocinas basales, concretamente un ambiente proinflamatorio basal, podría aportar mayor estimulación al CAR-T por una vía independiente a la estimulación antigénica del CAR. Para evaluar este factor intrínseco, la determinación de los niveles basales de citocinas involucradas en el SLC podría aportar información relevante como posible factor predictivo de riesgo de SLC. Sin embargo, en la práctica clínica habitual esto es frecuentemente de difícil implementación por motivos técnicos (gran variabilidad inter e intrapaciente, lentitud de los resultados, etc.). Sin embargo, la determinación de otros marcadores de inflamación inespecíficos tales como los niveles de PCR, procalcitonina y ferritina pueden servir como marcadores de inflamación basal más accesibles en la práctica clínica habitual.

Otro factor intrínseco que puede incrementar la intensidad de la expansión del CAR-T es la cantidad de estímulo antigénico¹⁴. Esto incluye principalmente la denominada “masa antigénica”, que abarca tanto la masa tumoral (p.ej. linfoblasto CD19+), como las células sanas que puedan compartir la misma diana antigénica (p.ej. linfocito B normal). Los tratamientos previos y su eficacia podrían modular la masa antigénica (masa tumoral ± aplasia de linfocitos B). Por lo tanto, a mayor masa tumoral, mayor masa antigénica, y por lo tanto mayor riesgo de SLC. Finalmente, además de la masa tumoral, factores como la dinámica tumoral observada en el momento de la infusión del CAR-T podrían también tener un impacto en esta expansión por el mismo mecanismo. A mayor dinámica o velocidad de replicación tumoral, mayor será el estímulo antigénico al que podría estar expuesto el CAR-T.

Respecto a los **factores extrínsecos**, un factor muy importante es el potencial biodinámico del producto celular utilizado. Si bien todos los productos CAR-T actualmente aprobados por la FDA/EMA, y la gran mayoría de productos en fases avanzadas de desarrollo comparten los mismos efectos de clase, estos pueden diferir en frecuencia e intensidad (ver capítulo 1).

Dependiendo de la actividad biodinámica de estos productos, los efectos secundarios pueden variar en frecuencia e intensidad. Dichos productos CAR-T difieren en

numerosos aspectos de su diseño, así como en su proceso de elaboración. Si bien la descripción de todos estos factores excede el objetivo de este capítulo, es habitual destacar uno de ellos: las moléculas coestimuladoras utilizadas en el constructo CAR. Actualmente, los productos comercializados difieren en la utilización de 4-1BB (tisagenlecleucel) o de CD28 (axicabtagene ciloleucel), ya que ambos comparten el dominio de coestimulación CD3z.

Otro factor extrínseco es la dosis de producto celular CAR-T a infundir, que viene determinada por la dosis máxima tolerada determinada en los respectivos ensayos clínicos de fase I-II. Al igual que el resto de las terapias antitumorales, a mayor dosis mayor efecto antitumoral. Sin embargo, también será mayor la toxicidad.

Será entonces el equilibrio entre la toxicidad y la eficacia lo que determine la dosis celular en aquellos productos que se administren en dosis “fijas” ajustadas o no al peso del paciente. Algunos ensayos clínicos académicos han puesto en práctica una tercera opción para definir la dosis, que incluye el fraccionamiento¹⁵ de una “dosis objetivo” normalmente ajustadas al peso del paciente, administrando todo o parte en función del desarrollo de síntomas relacionados al SLC. De esta forma se ajusta la dosis intrapaciente de una forma más funcional.

Finalmente, es de gran relevancia mencionar que el desarrollo e implementación de protocolos adecuados de inmunomodulación impactan de forma drástica en la seguridad de terapias celulares tales como la terapia CAR-T. No llevar a cabo protocolos adecuados de control del SLC puede tener graves consecuencias incluso con productos seguros y aprobados.

La utilización oportuna de fármacos inmunomoduladores tales como tocilizumab (bloqueador del receptor de la IL-6), corticosteroides tales como la metilprednisolona o la dexametasona, y otros inmunomoduladores en estudio tales como siltuximab (bloqueador directo de la IL-6) y anakinra (bloqueador del receptor de IL-1) forman parte fundamental de la terapia CAR-T.

Criterios diagnósticos y estadiaje de las principales toxicidades mediadas por células CAR-T

Síndrome de liberación de citocinas

Según el CTCAE v5.0¹⁶, el síndrome de liberación de citocinas (SLC) es un “trastorno caracterizado por fiebre, taquipnea, cefalea, taquicardia, hipotensión, *rash* y/o hipoxia causada por la liberación de citocinas”. Para aquellos productos (tisagenlecleucel y axicabtagene ciloleucel) e indicaciones (linfoma difuso de células grandes B [LDCGB], linfoma folicular transformado [LFT] y linfoma primario mediastínico [LPM]) aprobadas por la FDA/EMA, la mediana de inicio del SLC suele producirse entre los días 2 y 3 posteriores a la infusión del CAR-T, y tener una duración media de 7 a 8 días, dependiendo del producto utilizado y la indicación. Las manifestaciones principales del SLC incluyen el desarrollo de fiebre, hipotensión, hipoxia y taquicardia, pero puede estar también asociado a coagulopatía y disfunción orgánica, ya sea hepática, renal o cardíaca, entre otras (**Figura 3**)¹⁷.

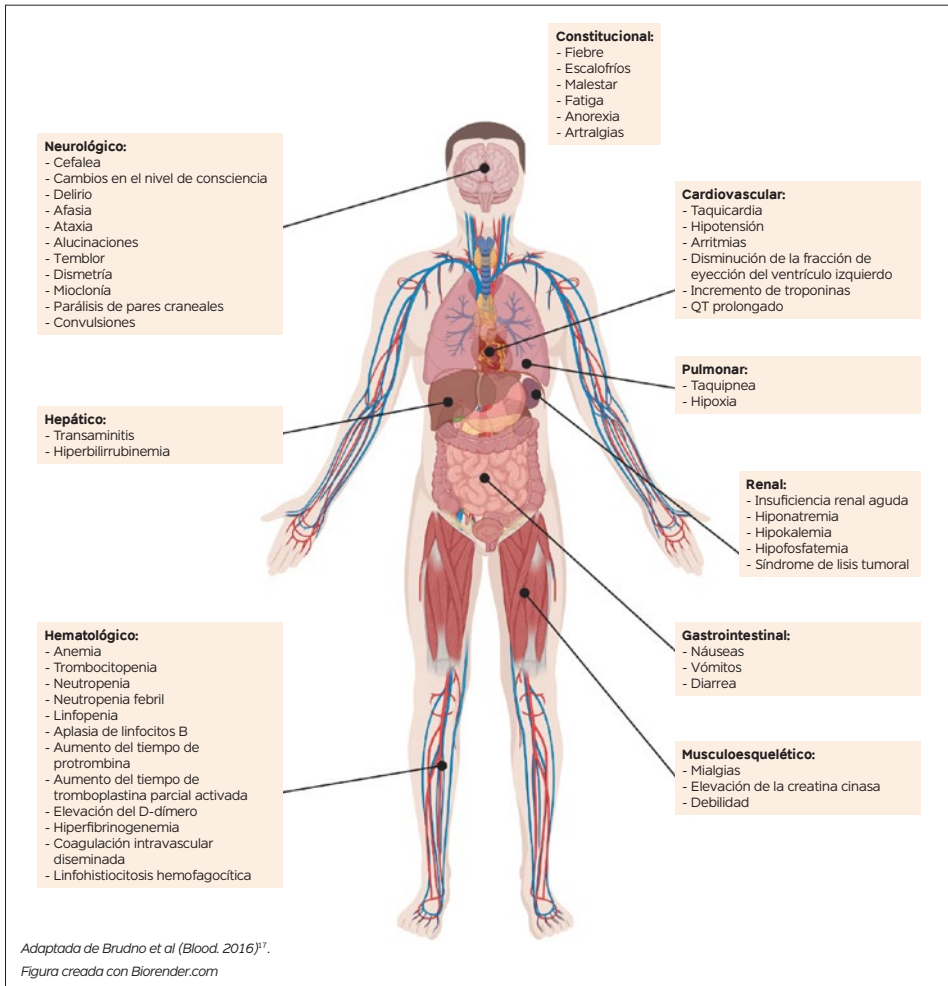


Figura 3. Toxicidades del SLC por sistema orgánico.

El desarrollo de cualquiera de estas alteraciones clínicas y analíticas sin otra causa que las justifique podría ser diagnóstico de SLC. Los criterios de diagnóstico y gradación del SLC se detallan en la **tabla 3**, propuesta por la *American Society for Transplantation and Cellular Therapy (ASTCT)*¹⁸.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Tabla 3. Consenso de gradación del SLC del ASTCT

Parámetro de SLC	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Fiebre*	Temperatura $\geq 38^\circ\text{C}$	Temperatura $\geq 38^\circ\text{C}$	Temperatura $\geq 38^\circ\text{C}$	Temperatura $\geq 38^\circ\text{C}$
con				
Hipotensión	No	Sin requerimiento de vasopresores	Con requerimiento de 1 vasopresor con o sin vasopresina	Con requerimiento de múltiples vasopresores (excluyendo la vasopresina)
y/o†				
Hipoxia	No	Con requerimiento de bajo‡ aporte de oxígeno por cánula nasal	Con requerimiento de alto‡ aporte de oxígeno por cánula nasal, mascarilla Venturi o similares	Con requerimiento de presión positiva (CPAP, BiPAP, intubación, ventilación mecánica)

Las toxicidades orgánicas asociadas al SLC podrán ser graduadas según el CTCAE v5.0 pero no influyen en esta graduación del SLC.

*La fiebre se define como temperatura $\geq 38^\circ\text{C}$ no atribuible a otra causa. En pacientes con SLC que han recibido tratamiento antipirético o anticitocinas tal como el tocilizumab o esteroides, la fiebre deja de ser requerida para la gradación subsecuente de la gravedad del SLC. En estos casos, la gravedad del SLC viene determinada por la hipotensión y/o hipoxia. †El grado de SLC está determinado por el evento de mayor gravedad: la hipotensión o hipoxia no atribuibles a otra causa. Por ejemplo, un paciente con temperatura de $39,5^\circ\text{C}$, hipotensión que requiere de 1 vasopresor, e hipoxia que requiere de aporte bajo de oxígeno es clasificado como un SLC grado 3. ‡Aporte de oxígeno de bajo flujo viene definido como un aporte de oxígeno ≤ 6 L/minuto. Aporte de oxígeno de alto flujo viene definido como un aporte de oxígeno ≥ 6 L/minuto.

Adaptada de Lee et al¹⁸.

- **SLC grado 1:** definido como la presencia de fiebre ($\geq 38^\circ\text{C}$) con o sin síntomas constitucionales (mialgia, artralgia, malestar).
- **SLC grado 2:** definido como la presencia de fiebre ($\geq 38^\circ\text{C}$) con hipotensión que no requiere de vasopresores y/o hipoxia que requiera del aporte de oxígeno a bajo flujo (≤ 6 L/minuto). Es importante mencionar que, a partir de este grado, debido al uso de antipiréticos, terapia anti-citocinas y corticosteroides, la fiebre podría no siempre estar presente junto con la hipotensión o hipoxia, ya que la fiebre suele ser la primera manifestación clínica en responder, mientras que la hipotensión y la hipoxia suelen demorarse más en el tiempo.
- **SLC grado 3:** definido como la presencia de fiebre ($\geq 38^\circ\text{C}$) con hipotensión que requiere del uso de 1 vasopresor y/o hipoxia que requiere del aporte de oxígeno a alto flujo (≥ 6 L/minuto).

- **SLC grado 4:** definido como la presencia de fiebre (≥ 38 °C) con hipotensión que requiere del uso de múltiples vasopresores y/o hipoxia que requiere del aporte de oxígeno a alto flujo (≥ 6 L/minuto) con presión positiva (CPAP, intubación, ventilación mecánica).
- **SLC grado 5:** definido como muerte atribuida al SLC.

Síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras

El inicio del síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras (ICANS) ocurre habitualmente durante o poco después de la resolución del SLC. Sin embargo, también puede ocurrir incluso en pacientes que no han llegado a desarrollar un SLC clínico. Para aquellos productos (tisagenlecleucel y axicabtagene ciloleucel) e indicaciones (LDCGB, LFT y LPM) aprobadas por la FDA/EMA, la mediana de inicio del ICANS está entre los días 4 y 6 posteriores a la infusión del CAR-T, y tener una duración media de 7 a 17 días, dependiendo del producto utilizado y la indicación.

Si bien las manifestaciones clínicas del ICANS pueden ser muy diversas, podría decirse que suele presentarse con un conjunto característico de síntomas. Excluyendo la cefalea, la cual suele atribuirse al espectro de síntomas correspondientes al SLC, típicamente suele comenzar a manifestarse con temblor, disgrafía, alteración de la atención, afasia de expresión, apraxia y letargo. Dicha sintomatología, cuando es leve, puede fluctuar de intensidad e incluso desaparecer y reaparecer días después de la resolución del SLC. Sin embargo, cuando es grave, puede presentarse incluso con episodios de convulsiones y coma, llegando incluso al edema cerebral (**Tabla 4**)¹⁸.

El diagnóstico de ICANS podrá realizarse ante la presencia de cualquier alteración neurológica previamente mencionada, siempre y cuando no haya otra causa que pueda justificarla. Respecto al estadiaje del ICANS, si bien los estudios iniciales en terapias CAR-T utilizaron los criterios del CTCAE para la gradación de la neurotoxicidad, posteriormente se han desarrollado sistemas de gradación más refinados que son los utilizados actualmente para evaluar la encefalopatía: el CARTOX-10 y más recientemente, el ICE (encefalopatía asociada a células inmunes efectoras) (**Tabla 5**)¹⁸. Por otra parte, para facilitar la gradación de encefalopatía en pacientes menores de 12 años se recomienda la escala de valoración de delirio pediátrico de Cornell (CAPD) (**Tabla 6**)^{19,20}.

Tabla 4. Reacciones adversas neurológicas y psiquiátricas reportadas con productos CAR-T aprobados

Tisagenlecleucel (Kymriah)	Axicabtagene ciloleucel (Yescarta)
<p>Encefalopatía: incluye trastorno cognitivo, estado confusional, disminución del nivel de consciencia, alteración de la atención, letargia, somnolencia y automatismos.</p> <p>Delirium: incluye, agitación, alucinaciones, alucinaciones visuales, irritabilidad, inquietud</p> <p>Cefalea: incluye migraña</p> <p>Ansiedad</p> <p>Trastornos del sueño: incluye trastorno del sueño, insomnio, pesadillas</p>	<p>Encefalopatía: incluye trastorno cognitivo, estado confusional, disminución del nivel de consciencia, alteración de la atención, hipersomnía, leucoencefalopatía, alteración de la memoria, cambios en el estatus mental, paranoia, somnolencia, estupor.</p> <p>Delirium: incluye agitación, desorientación, alucinaciones, hiperactividad, irritabilidad, inquietud</p> <p>Cefalea</p> <p>Mareo: incluye presíncope, síncope</p> <p>Afasia: incluye disfasia</p> <p>Disfunción motora: incluye espasmos musculares, debilidad muscular.</p> <p>Temblor</p> <p>Ataxia</p> <p>Convulsiones</p> <p>Discalculia</p> <p>Mioclónías</p>

Adaptada de Lee et al¹⁸.

Tabla 5. Herramientas de evaluación de la encefalopatía para la gradación del ICANS

CARTOX-10	ICE
<p>Orientación: al año, mes, ciudad, hospital, presidente/primer ministro del país de residencia: 5 puntos</p> <p>Nominación: habilidad de nombrar 3 objetos (p.ej. señalar un reloj, bolígrafo, botón): 3 puntos</p> <p>Escritura: habilidad de escribir una oración estándar (p.ej. "nuestra ave nacional es águila"): 1 punto</p> <p>Atención: habilidad de contar cuenta atrás de 100 restando de a 10: 1 punto</p>	<p>Orientación: al año, mes, ciudad, hospital: 4 puntos</p> <p>Nominación: habilidad de nombrar 3 objetos (p.ej. señalar un reloj, bolígrafo, botón): 3 puntos</p> <p>Seguir órdenes: habilidad de seguir órdenes simples (p.ej. "muéstrame 2 dedos" o "cierra tus ojos y saca la lengua"): 1 punto</p> <p>Escritura: habilidad de escribir una oración estándar (p.ej. "nuestra ave nacional es águila"): 1 punto</p> <p>Atención: habilidad de contar cuenta atrás de 100 restando de a 10: 1 punto</p>

El CARTOX-10 ha sido actualizado al ICE. La escala ICE añade evaluaciones de la capacidad de seguir órdenes. Puntuación: 10, sin alteración; 7-9, ICANS grado 1; 3-6, ICANS grado 2; 0-2, ICANS grado 3; 0 debido a paciente incapaz de despertar o incapaz de realizar la evaluación ICE, ICANS grado 4.

Adaptada de Lee et al¹⁸.

Tabla 6. Valoración de encefalopatía en niños menores de 12 años (CAPD)

Responda a lo siguiente basándose en interacciones con el niño a lo largo del turno médico

	Nunca, 4	Raramente, 3	A veces, 2	A menudo, 1	Siempre, 0
1. ¿El niño realiza contacto visual con el cuidador?					
2. ¿Las acciones del niño tienen un propósito?					
3. ¿El niño es consciente de su entorno?					
4. ¿El niño comunica necesidades y deseos?					
	Nunca, 4	Raramente, 3	A veces, 2	A menudo, 1	Siempre, 0
5. ¿El niño está inquieto?					
6. ¿El niño está inconsolable?					
7. ¿Está el niño poco activo? ¿Muy poco movimiento mientras está despierto?					
8. ¿Tarda el niño mucho tiempo en responder a las interacciones?					

Para pacientes de entre 1-2 años, las siguientes preguntas sirven como guías para las preguntas correspondientes: 1. Mantiene la mirada, prefiere al padre primario, mira a quien habla. 2. Coge y manipula objetos, intenta cambiar de posición, si tiene movilidad puede intentar levantarse. 3. Prefiere al padre primario, molesto cuando está separado de los cuidadores preferidos. Consolado por objetos familiares (p.ej., mantas o animales de peluche). 4. Usa palabras o signos simples. 5. Sin estado de calma sostenido. 6. No se calma con las acciones reconfortantes habituales, por ejemplo, cantar, abrazar, hablar y leer. 7. Poco o ningún juego, esfuerzos para sentarse, levantarse o movilizarse. 8. No sigue instrucciones simples. Si ya sabe hablar, no participa en diálogos simples con palabras o jerga.

Adaptada de Lee et al¹⁸.

Sin embargo, dichas escalas evalúan la encefalopatía, pero no incluyen la evaluación de otros ítems de relevancia tales como el nivel de consciencia, síntomas motores, convulsión, signos de elevación de la presión endocraneana/edema cerebral. Para una gradación completa del ICANS en pacientes mayores y menores a 12 años se recomienda entonces la utilización de las escalas de consenso propuestas por la ASTCT (**Tablas 7 y 8**)¹⁸ que sí incluye todos estos aspectos mencionados.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

Tabla 7. Gradación de consenso de ICANS del ASTCT (adultos)				
Dominio de neurotoxicidad	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Puntuación ICE*	7-9	3-6	0-2	0 (paciente incapaz de despertar e incapaz de realizar el ICE)
Nivel de consciencia disminuido†	Despierta espontáneamente	Despierta ante la voz	Despierta solo ante el estímulo táctil	Paciente incapaz de despertar o requiere un estímulo vigoroso o repetitivo para despertar. Estupor o coma
Convulsión	N/A	N/A	Cualquier convulsión clínica focal o generalizada que resuelva rápidamente o convulsiones subclínicas en el EEG que resuelven con intervención	Convulsión prolongada potencialmente mortal (>5 min); o convulsiones clínicas o subclínicas repetitivas sin recuperación al estado basal entre episodios
Hallazgos motores‡	N/A	N/A	N/A	Debilidad motora focal profunda tal como hemiparesia o paraparesia
Elevación de la PIC/edema cerebral	N/A	N/A	Edema focal/ local en neuroimagen§	Edema cerebral difuso en neuroimagen; postura de descerebración o decorticación; o parálisis de nervio craneal IV; o papiledema; o triada de Cushing

El grado del ICANS está determinado por el evento más grave (puntuación ICE, nivel de consciencia, convulsión, hallazgo motor, elevación de la PIC/edema cerebral) no atribuible a ninguna otra causa; por ejemplo, un paciente con puntuación de ICE de 3 que tiene una convulsión generalizada es clasificado como ICANS grado 3. N/A indica no aplicable. *Un paciente con puntuación ICE de 0 podría ser clasificado como ICANS grado 3 si está despierto con afasia global, pero un paciente con puntuación ICE de 0 podría ser clasificado como ICANS grado 4 si es incapaz de despertarse. †Nivel de consciencia disminuido no atribuible a otra causa (p.ej. sin medicación sedante). ‡Los temblores y mioclonías asociadas a terapias con células inmunes efectoras podrán ser graduadas según el CTCAE v5.0, pero no influyen la graduación del ICANS. §La hemorragia intracraneal con o sin edema asociado no se considera una característica de neurotoxicidad y es excluida de la graduación del ICANS. Podrá ser graduada según el CTCAE v5.0.

Adaptada de Lee et al¹⁸.

Tabla 8. Consenso de graduación del ICANS para niños del ASTCT				
Dominio de neurotoxicidad	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Puntuación ICE para niños ≥ 12 años*	7-9	3-6	0-2	0 (paciente incapaz de despertar e incapaz de realizar el ICE)
Puntuación CAPD para niños < 12 años	1-8	1-8	≥9	Incapaz de realizar CAPD
Nivel de consciencia disminuido†	Despierta espontáneamente	Despierta ante la voz	Despierta solo ante el estímulo táctil	Paciente incapaz de despertar o requiere un estímulo vigoroso o repetitivo para despertar. Estupor o coma
Convulsión	N/A	N/A	Cualquier convulsión clínica focal o generalizada que resuelva rápidamente o convulsiones subclínicas en el EEG que resuelven con intervención	Convulsión prolongada potencialmente mortal (>5 min); o convulsiones clínicas o subclínicas repetitivas sin recuperación al estado basal entre episodios
Debilidad motora‡	N/A	N/A	N/A	Debilidad motora focal profunda tal como hemiparesia o paraparesia
Elevación de la PIC/edema cerebral	N/A	N/A	Edema focal/local en neuroimagen§	Edema cerebral difuso en neuroimagen; postura de descerebración o decorticación; o parálisis de nervio craneal IV; o papiledema; o triada de Cushing

*El grado del ICANS está determinado por el evento más grave (puntuación ICE o CAPD, nivel de consciencia, convulsión, hallazgo motor, elevación de la PIC/edema cerebral) no atribuible a ninguna otra causa. La puntuación basal CAPD debería ser considerada antes de atribuir los hallazgos al ICANS. N/A indica no aplicable. *Un paciente con puntuación ICE de 0 podría ser clasificado como ICANS grado 3 si está despierto con afasia global, pero un paciente con puntuación ICE de 0 podría ser clasificado como ICANS grado 4 si es que es incapaz de despertar. †Nivel de consciencia disminuido no atribuible a otra causa (p.ej. sin medicación sedante). ‡Los temblores y mioclonías asociadas a terapias con células inmunes efectoras podrán ser graduadas según el CTCAE v5.0, pero no influyen en la graduación del ICANS. §La hemorragia intracraneal con o sin edema asociado no se considera una característica de neurotoxicidad y es excluida de la graduación del ICANS. Podrá ser graduada según el CTCAE v5.0.*

Adaptada de Lee et al¹⁸.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

- **ICANS grado 1:** definido como una puntuación de 7 a 9 en la escala ICE. Pacientes en este estadio suelen presentar cierta desorientación temporo-espacial, alteración en la escritura y somnolencia.
- **ICANS grado 2:** definido como una puntuación de 3 a 6 en la escala ICE. Pacientes en este estadio suelen presentar afasia de expresión, apraxias, anomias y problemas de concentración.
- **ICANS grado 3:** definido como una puntuación de 0 a 2 en la escala ICE. Pacientes en este estadio suelen presentar una afasia global grave y son incapaces de hablar o seguir órdenes. Cualquier episodio convulsivo clínico, sea simple, parcial o generalizado, o cualquier episodio convulsivo subclínico (electrocardiográfico) por sí solos ya cumplen con el criterio de ser un ICANS grado 3. La detección de la nueva aparición focal de edema también es criterio de grado 3.
- **ICANS grado 4:** definido como una puntuación de 0 en la escala ICE. Pacientes en este estadio suelen presentar estupor y coma, incluso llegando a precisar intubación para protección de las vías aéreas. Independientemente de esto, episodios prolongados o repetitivos de convulsiones clínicas o subclínicas (electrográficos) sin retorno a la normalidad entre episodios, o déficits focales motores profundos (hemiparesia o paraparesia) son considerados grado 4. Finalmente, pacientes con síntomas y signos de presión endocraneal elevada (cefalea con vómitos en proyectil, parálisis de nervios craneales, papiledema, disminución de consciencia, tríada de Cushing, postura de descerebración o decorticación y edema cerebral difuso en neuroimagen) son considerados grado 4.
- **ICANS grado 5:** definido como muerte atribuida al ICANS.

Manejo clínico de las principales toxicidades mediadas por células CAR-T

Para el control del SLC y del ICANS existen numerosas guías terapéuticas. Sin embargo, todas ellas comparten el uso de tocilizumab y corticosteroides como fármacos esenciales para el control de dichas complicaciones. Son, de hecho, los únicos fármacos aprobados actualmente por la FDA/EMA para el tratamiento de estas complicaciones, por lo que su uso previo es obligatorio antes de considerar la utilización de otros fármacos inmunomoduladores. A continuación, mencionamos las recomendaciones realizada de forma conjunta por la EBMT y el JACIE²¹.

Manejo del síndrome de liberación de citocinas (Figura 4)

Una vez instaurado el SLC grado 1, las recomendaciones apuntan a procurar descartar un posible origen infeccioso mediante la realización de cultivos y mediante la instauración de tratamiento antimicrobiano empírico, además del inicio de tratamiento sintomático de la fiebre.

Una vez avanzado hacia un SLC grado 2 o, en su defecto, en pacientes con SLC grado 1 persistente durante al menos 3 días, se recomienda el inicio del tratamiento específico anticitocinas. Actualmente, la primera línea de tratamiento consiste en la administración de tocilizumab hasta un máximo de 4 dosis consecutivas.

Tocilizumab

Anticuerpo monoclonal humanizado frente al receptor de IL-6. Es capaz de bloquear con la misma afinidad tanto al IL-6R como al IL-6Rs, lo que implica una disminución de la señalización de la IL-6 por ambas vías (clásica y transactivación), por lo que es

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

capaz de reducir la activación inmune y la inflamación²². Sin embargo, tiene muy escasa capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, a diferencia de la IL-6 que sí puede atravesarla. Es por lo tanto capaz de bloquear la respuesta inflamatoria fuera del sistema nervioso, pero es incapaz de hacerlo dentro. Aprobado por la FDA/EMA, ha demostrado ser eficaz para controlar el SLC aparentemente sin afectar de forma significativa la expansión del CAR-T²³.

En casos de pacientes que se muestren refractarios al tocilizumab (incluso antes de haber completado la administración de las 4 dosis máximas), se podrá iniciar tratamiento de segunda línea con corticosteroides.

Corticosteroides

La utilización de corticoides sistémicos ha demostrado ser eficaz en el control del SLC debido a sus potentes y bien conocidas propiedades antiinflamatorias. Su uso está actualmente restringido a casos de SLC refractarios al tocilizumab. Si bien inicialmente se temía que su uso podría disminuir la eficacia de la terapia CAR-T, estudios recientes sugieren que su uso, incluso siendo prolongado (mayor de 7 días), no parecen afectar significativamente la eficacia de la terapia CAR-T²⁴⁻²⁶. Estos hallazgos han llevado a la realización de nuevos ensayos clínicos donde se adelanta su administración a fases más precoces e incluso profilácticos^{27,28}.

Una vez iniciado el tratamiento con corticosteroides, se podrá escalar su dosis en función de la respuesta obtenida incluso hasta llegar a dosis equivalentes a metilprednisolona 1.000 mg/d EV para SLC grado 4. Paralelamente, una vez agotado el uso del tocilizumab, y en caso de que el paciente persista con un SLC activo e incontrolado a pesar del tratamiento, se podrá considerar el uso de otros inmunomoduladores sin evidencia de eficacia en SLC, pero que teóricamente podrían ser útiles: siltuximab, anakinra y dasatinib.

Siltuximab

Anticuerpo monoclonal (humano-murino) capaz de bloquear directamente la IL-6. Impide la unión de la IL-6 tanto sobre los receptores solubles (IL-6Rs) como a los receptores de membrana de la IL-6 (IL-6R), inhibiendo así la señalización de IL-6 por ambas vías (clásica y transactivación). Si bien actualmente se encuentra aprobado (FDA/EMA) para el tratamiento de la enfermedad de Castleman multicéntrica (ECM) VIH y VHH8 negativos, todavía no cuenta con la aprobación para su uso en el SLC. Debido a que es capaz de bloquear directamente a la IL-6, se cree que su uso podría tener una

ventaja teórica sobre el tocilizumab para la prevención y tratamiento del ICANS. Esto sucede ya que al secuestrar directamente la IL-6 impide el característico incremento transitorio en los niveles de IL-6 séricos que suele observarse tras la administración de tocilizumab, disminuyendo de esta forma la exposición del SNC a dicho incremento. Además, al tratarse de una molécula con un tamaño molecular menor que el del tocilizumab se cree que podría ser capaz de cruzar la barrera hematoencefálica con mayor facilidad, aunque esto no está demostrado. Sin embargo, su eficacia para el control de ambas complicaciones (SLC e ICANS) no ha sido demostrada en ensayos clínicos. Si bien la dosis recomendada de siltuximab es de 11 mg/kg en la ECM, para su uso en SLC no existe un consenso claro que defina la dosis adecuada de administración. Su uso actualmente está limitado a pacientes con SLC refractarios a tocilizumab y corticosteroides²⁹.

Anakinra

Inhibe la actividad biológica de la IL-1 (IL-1 α y IL-1 β) mediante el bloqueo del receptor humano de la IL-1 (IL-1R). Si bien actualmente se encuentra aprobado (FDA/EMA) para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide, síndromes periódicos asociados a criopirina (CAPS) y enfermedad de Still, todavía no cuenta con la aprobación para su uso en el SLC. Aunque se cree que la IL-1 cumple un papel fundamental en el desarrollo del SLC y del ICANS, y que, por lo tanto, teóricamente es un fármaco que podría ser utilizado para el tratamiento de los mismos^{2,30}, su eficacia para el control de ambas complicaciones no ha sido demostrada en ensayos clínicos.

Dasatinib

Inhibidor de tirosina cinasa aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. Diversos estudios han mostrado que es un fármaco capaz de inhibir la activación de linfocitos T mediante la inhibición de las cinasas de señalización Src, Fyn y Lc³¹. Si bien esto se ha demostrado a nivel preclínico³², faltan datos que confirmen su eficacia en pacientes con SLC.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

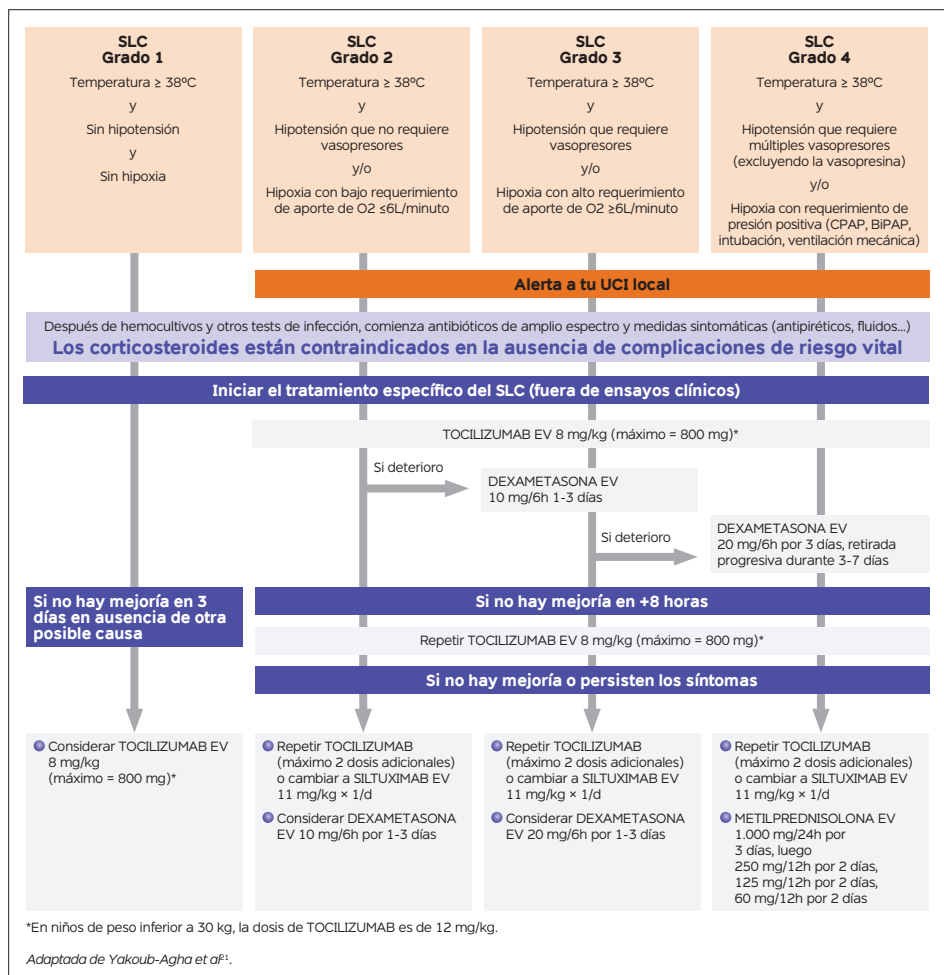


Figura 4. Manejo del síndrome de liberación de citocinas (SLC).

Manejo del síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras (Figura 5)

- Una vez instaurado el ICANS grado 1, las recomendaciones plantean descartar otro posible origen mediante la realización de resonancia magnética cerebral, electroencefalograma y punción lumbar diagnóstica. Sin embargo, actualmente no se recomienda como práctica habitual el inicio del tratamiento específico con corticosteroides en estadios tan precoces.

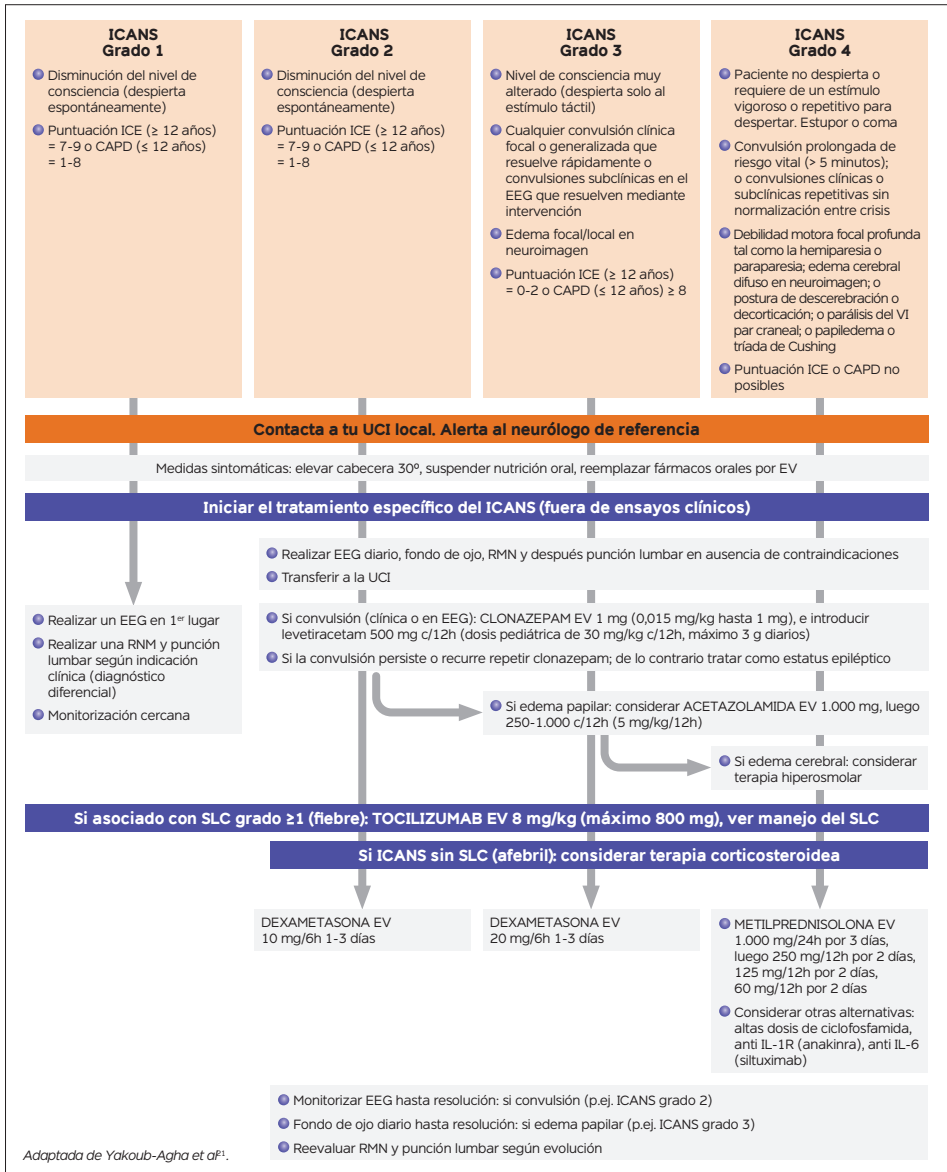


Figura 5. Manejo del síndrome de neurotoxicidad asociada a células inmunes efectoras (ICANS).

- En caso de que el ICANS avance hacia un grado 2, se recomienda el inicio del tratamiento específico antiinflamatorio mediante la administración de corticosteroides, partiendo de dosis equivalentes a dexametasona 10 mg/6h EV, que se podrá es- calar en función de la respuesta obtenida incluso hasta dosis equivalentes a metil-

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

prednisolona 1.000 mg/d EV para ICANS grado 4, para luego desescalar progresivamente en función de la respuesta obtenida.

- En casos de refractariedad incluso a las dosis máximas de corticosteroides, se podrá considerar la utilización de los fármacos inmunomoduladores anakinra y siltuximab, previamente mencionados.

Conclusiones

- El desarrollo de nuevas y complejas terapias tales como la terapia CAR-T traen consigo una variedad de nuevas complicaciones potencialmente fatales tales como el SLC y el ICANS.
- El éxito de la terapia celular CAR-T depende en gran medida de que la comunidad médica aprenda a controlar sus toxicidades, y sea capaz de desarrollar nuevos protocolos y nuevos fármacos capaces de optimizar nuestra capacidad de modulación de la respuesta inmunitaria.
- Para esto es crucial un mayor entendimiento en las bases fisiopatológicas que gobiernan a estas complicaciones con el fin de optimizar su abordaje de una forma racional.
- Actualmente existe cierto consenso a nivel mundial sobre los protocolos de manejo del SLC/ICANS. Sin embargo, debido al rápido avance en la realización de nuevos ensayos clínicos que buscan optimizar estos protocolos, las guías actuales están sujetas a ser revisadas de forma continua.
- Cuestiones tales como el tipo de fármaco, la dosis y el momento óptimos, así como su posible impacto sobre la eficacia de la terapia CAR-T, son cuestiones que están lejos de estar claramente definidas.

Bibliografía

1. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev.* 2014;257(1):107-126.
2. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med.* 2018;24(6):739-48.
3. Wang Z, Han W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy. *Biomark Res.* 2018;6:4.

4. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(6):664-79.
5. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(5):878-88.
6. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014;124(2):188-95.
7. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(6 Pt A):1218-27.
8. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-83.
9. Tosato G, Jones KD. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood.* 1990; 75(6):1305-10.
10. Krüttgen A, Rose-John SJ. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *Interferon Cytokine Res.* 2012;32(2):60-5.
11. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy.* 2016;8(8):959-70.
12. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16(5):448-57.
13. Gust J, Hay KA, Hanafi LA, et al. Endothelial activation and blood-brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discov.* 2017;7:1404-19.
14. Frey N, Porter D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(4):e123-e127.
15. Frey NV, Shaw PA, Hexner EO, et al. Optimizing chimeric antigen receptor T-cell therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2020;38(5):415-22.
16. National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). Version 5.0.
17. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood.* 2016; 127(26): 3321-30.
18. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(4):625-38.
19. Mahadeo KM, Khazal SJ, Abdel-Azim H, et al. Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16:45-63.
20. Traube C, Silver G, Kearney J, et al. Cornell Assessment of Pediatric Delirium: a valid, rapid, observational tool for screening delirium in the PICU. *Crit Care Med.* 2014;42:656-63.
21. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica.* 2018;105(2):297-316.
22. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;181:151-60.
23. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra25.
24. Santomasso B, Bachier C, Westin J, Rezvani K, Shpall EJ. The other side of CAR T-cell therapy: cytokine release syndrome, neurologic toxicity, and financial burden. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2019;39:433-44.
25. June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med.* 2018;379(1):64-73.
26. Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells. *Blood.* 2019;133(20):2212-21.
27. Topp MS, van Meerten T, Wermke M, et al. Preliminary results of earlier steroid use with axicabtagene ciloleucel (axi-cel) in patients with relapsed/refractory large B-cell lymphoma (R/R LBCL). 2019. *J Clin Oncol.* 2019;37(suppl):abstr 7558.
28. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Preliminary results of prophylactic tocilizumab after axicabtagene ciloleucel (axi-cel; KTEC19) treatment for patients with refractory, aggressive Non-Hodgkin Lymphoma (NHL). *Blood.* 2017;130 (Suppl 1):1547.
29. Mahmoudjafari Z, Hawks KG, Hsieh AA, et al. American Society for Blood and Marrow Transplantation Pharmacy Special Interest Group survey on chimeric antigen receptor T cell therapy administrative, logistic, and toxicity management practices in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(1):26-33.
30. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med.* 2018;24(6):731-8.
31. Montero JC, Seoane S, Ocana A, Pandiella A. Inhibition of Src family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011;17(17):5546-52.
32. Weber EW, Lynn RC, Sotillo E, Lattin J, Xu P, Mackall CL. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv.* 2019;3(5):711-17.

CAPÍTULO 4

Desarrollo de nuevos CAR-T: el futuro ya está aquí

Estefanía García Guerrero

*Servicio de Hematología, Hospital Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla,
Sevilla.*

Introducción

La terapia CAR está protagonizando una nueva era en el campo de la inmunoterapia y, en concreto, en la hematología actual. El notable éxito de las células CAR-T en pacientes con ciertos subtipos de leucemia o linfoma de células B, con una eficacia prometedora también observada en pacientes con mieloma múltiple, ha demostrado la actividad terapéutica de estas células CAR-T. Sin embargo, el aumento del número de pacientes tratados con esta terapia y la recaída de la enfermedad están mostrando las actuales limitaciones de esta modalidad terapéutica. En concreto, dichas limitaciones son las toxicidades relacionadas con el tratamiento, el escape inmunológico por pérdida de expresión del antígeno tumoral, el bloqueo de la eficacia por presencia de antígeno soluble, así como la activación y persistencia *in vivo* subóptima de las células CAR-T. La optimización de los diseños convencionales de las células CAR-T es necesaria para abordar estas limitaciones y expandir el uso de estas células genéticamente modificadas a una gama más amplia de tumores malignos.

Descripción técnica de los CAR-T

Recientemente, la terapia adoptiva de células T (ACT, por sus siglas en inglés) es un enfoque inmunoterapéutico eficaz para el tratamiento del cáncer que se basa en la infusión de células T específicas de tumor en el paciente¹. Un avance significativo en el campo de la ACT es la capacidad de conferir a las células T especificidad por antígenos tumorales o moléculas de superficie de células tumorales mediante la introducción de genes que codifican receptores sintéticos de antígeno quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés)². En la era de la medicina personalizada, las células T o subconjuntos de células T pueden aislarse de la sangre del paciente y modificarse genéticamente para expresar un transgén que codifica un CAR dirigido frente a tumor. Las células T genéticamente modificadas se expanden *in vitro* y, si es necesario, se enriquecen antes de la infusión al paciente. Al mismo tiempo, se puede administrar al paciente una quimiorradioterapia de acondicionamiento para eliminar los linfocitos endógenos antes de la infusión de células CAR-T con el fin de mejorar la persistencia de dichas células infundidas.

En concreto, los CAR son receptores sintéticos que vinculan la especificidad de antígeno de un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés) con las capacidades citotóxicas y proliferativas de las células T³ (**Figura 1**). De modo que, los CAR están compuestos por diversos dominios con funciones específicas (**Tabla 1**):

- Un dominio extracelular de reconocimiento derivado del fragmento variable de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés) de un anticuerpo monoclonal, que reconoce y se une al antígeno tumoral.
- Un dominio espaciador extracelular (en inglés, *spacer*), el cual proporciona flexibilidad y alcance para la unión al antígeno.
- Un dominio transmembrana (TM, por sus siglas en inglés), el cual une el dominio extracelular a un módulo de señalización/activación intracelular.
- Un dominio de señalización intracelular, compuesto más comúnmente por la cadena CD3 ζ derivada del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) y uno o más dominios coestimuladores como CD28 o 4-1BB.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

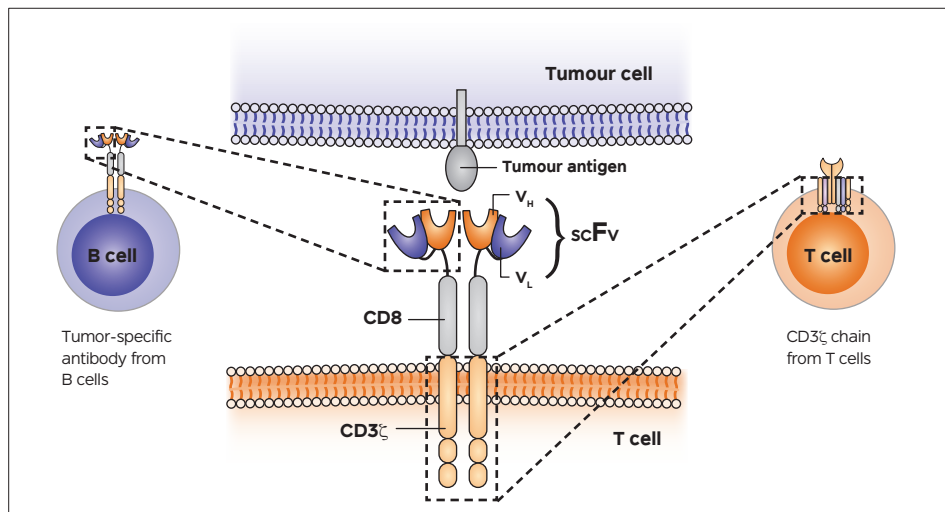


Figura 1. Diseño de un CAR convencional (modificado de Kershaw *et al*).

Tabla 1. Diseño de un CAR: dominios y sus funciones			
Dominios CAR	Región	Función	Tipos
scFv	Extracelular	Reconocimiento del antígeno tumoral	Murino, humanizado, humano
Espaciador	Extracelular	Proporciona flexibilidad	IgG1, IgG2, IgG4, CD8, CD28
Transmembrana	Transmembrana	Anclaje a la membrana celular	CD28, CD8α, CD3ζ, CD4
Coestimulación	Intracelular	Mejorar la fuerza y la persistencia de la señalización	CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27
Señalización	Intracelular	Transmitir la señal de activación al interior celular	CD3

En comparación con los TCR naturales, los CAR tienen afinidades más altas para reconocer a los antígenos de varios órdenes de magnitud que los hacen más potentes en la erradicación de tumores⁴. Además, los CAR reconocen proteínas intactas de la superficie celular de manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, la mayoría de los enfoques basados en células CAR son insensibles a los mecanismos de escape tumoral relacionados con las variantes de pérdida de MHC⁵.

La construcción de un CAR se basa en la identificación de un anticuerpo monoclonal adecuado que se une a una molécula de interés de la superficie celular. Debido a que el reconocimiento mediado por CAR no se basa en el procesamiento o la presentación de péptidos por MHC, el número de epítopos diana es estequiométricamente igual al número de moléculas de antígeno diana en la superficie celular, y cada molécula diana expresada en la superficie representa un posible epítipo desencadenante de la activación de la célula CAR-T, lo que contribuye a la potencia de este enfoque. Sin embargo, la identificación de antígenos expresados de forma única o sobreexpresados por las células tumorales y el uso de esos antígenos como dianas inmunológicas para desencadenar respuestas de células T específicas de antígeno en pacientes sigue siendo un desafío⁶.

El dominio espaciador extracelular constituye un componente importante en el diseño de un CAR. Dicho dominio proporciona flexibilidad para acceder al antígeno diana. Varios estudios han demostrado que la longitud óptima del espaciador de un CAR determinado depende de la posición del epítipo diana⁷. Los espaciadores de larga longitud proporcionan flexibilidad adicional al CAR y permiten un mejor acceso a los epítopos próximos a la membrana celular tumoral⁸. En contraste, los CAR que tienen dominios espaciadores más cortos son más efectivos a la hora de unirse a epítopos distales de la membrana celular tumoral^{9,10}. De modo que se ha propuesto que la longitud del dominio espaciador es crucial para proporcionar una distancia intercelular adecuada entre la célula CAR-T y la célula tumoral para la formación de la sinapsis inmunológica¹¹, destacando la necesidad de optimizar los dominios espaciadores para cada epítipo diana en concreto.

El dominio de señalización intracelular es también de vital importancia en el diseño del CAR para que las células CAR-T cumplan su función antitumoral. En este sentido, los CAR iniciales conocidos como CAR de primera generación, contenían un solo dominio de señalización citoplasmática (cadena CD3 ζ) sin dominios de coestimulación. Los CAR de segunda y tercera generación se han desarrollado mediante la adición de uno o dos dominios coestimuladores al dominio de señalización (cadena CD3 ζ) para aumentar su citotoxicidad, producción de citocinas y proliferación.

La función más importante de los dominios de coestimulación es mejorar la fuerza y la persistencia de la señalización, aumentando en consecuencia la potencia de activación de la célula CAR-T¹². A modo de ejemplo, Kowolik *et al*¹³ compararon células CAR-T de primera generación, que se componían de un scFv dirigido a CD19 junto con el dominio de señalización CD3 ζ , con células CAR-T de segunda generación a las que acoplaron la región coestimuladora CD28; y pudieron observar que los CAR de prime-

ra generación presentaban cierta actividad *in vitro* pero con una eficacia preclínica *in vivo* muy limitada. Este trabajo demostró que la inclusión de un dominio coestimulador, como el CD28 o el 4-1BB, con el dominio de señalización CD3 ζ en un CAR de segunda generación era suficiente para mediar la destrucción robusta de células tumorales en modelos de ratones inmunodeficientes de tumores malignos de células B humanas¹³. Las moléculas coestimuladoras CD28 y 4-1BB son las más comúnmente usadas en ensayos clínicos de células CAR-T, aunque nuevas moléculas coestimuladoras como ICOS u OX40 están siendo evaluadas, especialmente en pacientes con tumores sólidos^{14,15}. Actualmente, existe una cuarta generación de CAR, en los que para mejorar aún más la respuesta inmune se introducen genes en las células CAR-T que expresan citocinas. Este nuevo enfoque, en el que las células CAR-T proporcionan factores de crecimiento autocrinos y citocinas estimuladoras, tiene el objetivo de proteger las células CAR-T del ambiente supresor tumoral. En este contexto, se han explorado citocinas inmunoestimuladoras tales como IL-2, IL-15 e IL-12¹⁶.

Conclusiones

- La terapia adoptiva de células T se basa en la infusión de células T específicas de tumor en el paciente.
- Los CAR son receptores sintéticos compuestos por un dominio extracelular de reconocimiento derivado de un anticuerpo monoclonal, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular, compuesto por la cadena CD3 ζ derivada del TCR y uno o más dominios coestimuladores.
- Los CAR reconocen proteínas intactas de la superficie celular de manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad.
- El dominio espaciador debe ser optimizado para cada epítipo diana.
- Existen actualmente cuatro generaciones de CAR: los CAR de primera generación que incluyen solo CD3 ζ como dominio de señalización intracelular, mientras que los CAR de segunda generación incluyen un dominio coestimulador único; los CAR de tercera generación incluyen dos o más dominios coestimuladores; y los CAR de cuarta generación incluyen genes que expresan citocinas.

Nuevas estrategias en el desarrollo de linfocitos CAR-T

Los resultados obtenidos haciendo uso de la terapia con linfocitos CAR-T están siendo muy prometedores, sobre todo teniendo en cuenta que, actualmente, es una terapia empleada en pacientes altamente refractarios con numerosas líneas de tratamiento. Sin embargo, el aumento del número de pacientes tratados con células CAR-T, las toxicidades observadas, así como el paso del tiempo permitiendo analizar datos de durabilidad de las respuestas, han dejado en relieve las actuales limitaciones de esta atractiva terapia celular. Algunas de estas limitaciones son las toxicidades relacionadas con el tratamiento, recaídas debido al escape inmunológico al disminuir o desaparecer la expresión del antígeno diana, disminución de la eficacia de las células CAR-T debido a la existencia de proteínas dianas solubles y una defectuosa persistencia de las células CAR-T en el paciente. En la actualidad se están llevando a cabo nuevas estrategias en el desarrollo de linfocitos CAR-T que han originado la creación de novedosos productos CAR-T más potentes (**Tabla 2**).

Tabla 2. Limitaciones actuales de la terapia CAR: Efectos y soluciones

Limitaciones actuales terapia CAR	Efectos	Soluciones
Toxicidades	<ul style="list-style-type: none"> ● Sistémicas (síndrome de liberación citocinas, neurotoxicidad) ● Toxicidades en células diana no tumorales 	<ul style="list-style-type: none"> ● Optimización del diseño del CAR (scFv humano o humanizado, dominio coestimulador apropiado) ● Adición de genes marcadores y suicidas ● <i>Affinity tuning</i> ● Nuevas generaciones de CAR: Split CAR, ON-Switch CAR, AND-gate CAR, iCAR
Escape inmunológico	<ul style="list-style-type: none"> ● Recaídas antígeno negativas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Coadministración de diversos productos CAR ● Bicistronic CAR ● Tandem CAR
Presencia proteína diana soluble	<ul style="list-style-type: none"> ● Reducción de la densidad antigénica ● Bloqueo del CAR debido a la unión con proteína soluble 	<ul style="list-style-type: none"> ● Optimizar el dominio de unión a antígeno, scFv ● Inhibición de la escisión de la proteína soluble
Persistencia <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Recaídas antígeno positivas ● Ausencia del CAR <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Uso de productos CAR enriquecidos en células TN/TSCM ● Ratio CD4:CD8 1:1 ● Optimización de la linfodepleción ● CAR alogénicos, universales

Nuevas estrategias para disminuir toxicidades

Las células CAR-T deben alcanzar un nivel de activación y secreción de citocinas sin exceder un nivel umbral que provoque la liberación descontrolada de citocinas, con el objetivo de lograr una eficacia clínica sin toxicidades. El grado y la cinética de activación de las células CAR-T van a depender, entre otros factores, de la carga tumoral, el nivel de expresión del antígeno en las células tumorales, la afinidad del scFv por el antígeno y los dominios coestimuladores incluidos en el CAR^{17,18}. Por lo tanto, la ventana terapéutica de activación de las células CAR-T será diferente en distintos CAR y deberá establecerse para cada CAR. Sin embargo, para controlar esta ventana terapéutica se pueden optimizar varios componentes del CAR¹⁹. En primer lugar, el módulo de unión al antígeno del CAR (scFv) puede ser reconocido por las propias células inmunes del paciente y las posteriores respuestas inmunes también pueden contribuir a la toxicidad observada en esta modalidad terapéutica. El uso de fragmentos de anticuerpos

humanos o humanizados para la construcción del CAR²⁰, en lugar de los derivados de anticuerpos de ratón^{21,22}, podría ser una estrategia para reducir la inmunogenicidad del CAR. En este sentido y a modo de ejemplo, se han desarrollado y probado varios productos CAR-T con scFv de origen humano contra BCMA como JCARH1²³ y MCARH171²⁴, que muestran toxicidades manejables (9% y 20% de SLC grado ≥ 3 ; y 7% y 0% de neurotoxicidad grado ≥ 3 , respectivamente). Otros aspectos del diseño del CAR, como el dominio espaciador extracelular y/o el dominio transmembrana, también podrían contribuir a reducir la inmunogenicidad del CAR^{9,25}. Por otro lado, la elección del dominio coestimulador es un factor clave en la optimización del diseño del CAR para reducir la toxicidad relacionada con el tratamiento. Actualmente, los dominios coestimuladores más utilizados en terapia CAR-T son el CD28 y el 4-1BB. El uso de la molécula coestimuladora CD28 se ha correlacionado con una activación rápida y pronunciada de las células CAR-T y, por lo tanto, con un posterior inmunofenotipo de agotamiento celular. Por otro lado, las células CAR-T diseñadas con la molécula coestimuladora 4-1BB presentan un pico de expansión más bajo, lo que resulta en una persistencia prolongada y un menor riesgo de toxicidades mediadas por citocinas^{26,27}. La incorporación del dominio coestimulador 4-1BB podría ser el más óptimo y menos tóxico en pacientes con una alta carga tumoral o con tumores con una alta densidad de antígeno; por el contrario, un dominio CD28 podría ser necesario para alcanzar el umbral requerido de activación de células CAR-T en el contexto de una baja densidad antigénica o un CAR con un dominio de unión a antígeno de baja afinidad. Por lo tanto, la elección del dominio coestimulador ofrece una variable modificable en el diseño del CAR que puede adaptarse al tipo de tumor y la carga tumoral, al antígeno diana y su densidad antigénica, y al scFv específico utilizado.

Además de optimizar el diseño del CAR, se están desarrollando diversas estrategias de seguridad que incluyen la adición de genes marcadores y suicidas al gen CAR, proporcionando de esta manera la posibilidad de eliminar las células CAR-T si se producen toxicidades mediadas por dichas células. Un ejemplo de ello es el receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico (EGFRt, por sus siglas en inglés), el cual se coexpresa en la superficie celular de las células T junto con el CAR. Este gen EGFRt es una versión truncada del gen original EGFR que solo contiene la parte extracelular del receptor y que, por tanto, es inocuo una vez expresado en la superficie de la célula CAR-T sirviendo además de marcador de transducción celular²⁸. Sin embargo, dicho marcador puede ser reconocido por el anticuerpo monoclonal cetuximab, aprobado clínicamente, de forma que dicha unión conllevaría la eliminación de las células CAR-T en caso de que fuera necesario²⁹. Del mismo modo, el marcador RQR8 ha sido recientemente publicado como otro marcador de transducción que contiene un epítipo sus-

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

ceptible de ser reconocido por rituximab, pudiendo conllevar de nuevo la eliminación de las células CAR-T en caso de observar toxicidades³⁰. Del mismo modo, el gen inducible de caspasa 9 (iCasp9) constituye un sistema alternativo de seguridad para limitar las toxicidades asociadas a las células CAR-T. El gen iCasp9 contiene la porción intracelular de la proteína caspasa 9 humana, una molécula proapoptótica, fusionada a un dominio de unión a fármacos derivado de la proteína humana de unión a FK506^{31,32}. La administración intravenosa de AP1903, un fármaco químico inocuo, produce la dimerización de los dominios de unión a fármacos de esta proteína quimérica, que a su vez conlleva la dimerización de la caspasa 9. Esta dimerización conduce a una forma activada de la molécula, la cual propicia una cascada de señalización que provoca, en última instancia, la apoptosis de la célula transducida^{33,34}.

Encontrar un antígeno restringido exclusivamente a tumor con el objetivo de prevenir las toxicidades en células diana no tumorales es una de las principales preocupaciones en el desarrollo de células CAR-T. Los antígenos diana de las células CAR-T actuales suelen estar presentes también en la superficie de células no malignas, aunque a un nivel más bajo. Sin embargo, este nivel de expresión bajo podría conducir a toxicidades graves³⁵. El notable éxito de las células CD19 CAR-T en pacientes con neoplasias malignas de células B se acompaña de aplasia de células B como resultado de la eliminación de los progenitores de células B positivas para CD19. Como consecuencia, se observa un nivel reducido de inmunoglobulina en el suero de estos pacientes³⁶. Para superar esta toxicidad comúnmente observada se realizan infusiones periódicas de inmunoglobulinas^{37,38}. Aunque esta estrategia es manejable en el caso de los CD19 CAR, cabe destacar que la aplicación clínica de numerosos CAR podría estar limitada debido a toxicidades menos manejables como consecuencia del uso de otros antígenos candidatos asociados (pero no restringidos) a tumores como diana inmune. Sin embargo, actualmente se están desarrollando múltiples estrategias para reducir este tipo de toxicidades y ofrecer nuevos productos de células CAR-T clínicamente eficaces.

Una de estas estrategias podría ser la denominada *affinity tuning*, que se basa en las diferencias en el nivel de densidad antigénica entre las células tumorales y normales. La generación de células CAR-T de baja afinidad (scFV de baja afinidad por el antígeno diana) podría emplearse para dirigir la respuesta citotóxica a antígenos expresados a una densidad más alta en las células tumorales que en las células normales, siendo más probable el reconocimiento de las células tumorales y, por lo tanto, la activación de las células CAR-T únicamente frente al tumor. Esta estrategia ha sido testada en diversos estudios preclínicos^{39,40}. En el contexto del mieloma, Drent *et al*⁴¹ evaluaron la toxicidad y efecto antitumoral de células CD38 CAR-T de baja afinidad,

las cuales presentaban una afinidad por el antígeno diana hasta 1.000 veces menor. Es bien conocido que la proteína CD38 está altamente expresada en las células B precursoras, células plasmáticas, células NK, células T activadas y precursores mieloides. El CD38 también se expresa en el intestino, células epiteliales de la próstata, el páncreas, el sistema nervioso y las células musculares y los osteoclastos⁴². De modo que esta amplia expresión de CD38 constituye un impedimento para la aplicación clínica de los CD38 CAR-T convencionales debido a las posibles toxicidades en células diana no tumorales. Sin embargo, las células CD38 CAR-T con afinidad disminuida mostraron ser efectivas contra las células de mieloma CD38+, mientras que las células hematopoyéticas sanas CD38+ no resultaron afectadas⁴¹. Sin embargo, un posible inconveniente de este enfoque es el escape inmunológico debido a la disminución de la expresión del antígeno diana.

Otros enfoques se basan en la restricción del reconocimiento de las células normales por parte del CAR optimizando la interacción específica con las células tumorales, ya sea incluyendo el reconocimiento de dos antígenos tumorales para la activación de la célula CAR-T o limitando la actividad espacial y temporal de las células CAR-T (**Figura 2**).

A este respecto, se han explorado los denominados “Split CAR”, los cuales se basan en la coexpresión de dos módulos diferentes, uno que contiene un scFv dirigido frente a un antígeno A junto con el dominio de señalización CD3 ζ (señal 1) y el segundo que contiene un scFv diferente dirigido frente al antígeno B junto con un dominio coestimulador (CD28, 4-1BB)^{43,44}. Con esta estrategia, el reconocimiento de un solo antígeno, como pudiera ocurrir en el caso de la célula normal, puede dar como resultado una activación subóptima de las células CAR-T y una toxicidad limitada. Por otro lado, cuando ambos antígenos están presentes, como en las células tumorales, puede darse el doble reconocimiento dando lugar a una activación robusta de las células CAR-T⁴⁴. Una estrategia alternativa consiste en “ON-switch CAR” en los que el dominio de unión al antígeno se disocia del dominio de señalización (CD3 ζ), y la activación de las células CAR-T se controla mediante una molécula que induce la dimerización de ambas partes⁴⁵. De modo que la intensidad de las respuestas de las células CAR-T depende de la dosis de molécula dimerizante añadida. Recientemente han surgido también los “AND-gate CAR”. En esta estrategia, el reconocimiento del primer antígeno es mediado por el receptor sintético Notch. Esta unión induce la escisión del factor de transcripción que permite la expresión del gen CAR dirigido frente al segundo antígeno. La expresión del CAR en la superficie celular permite la activación de las células T después del reconocimiento del segundo antígeno. Por lo tanto, la expresión del CAR

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

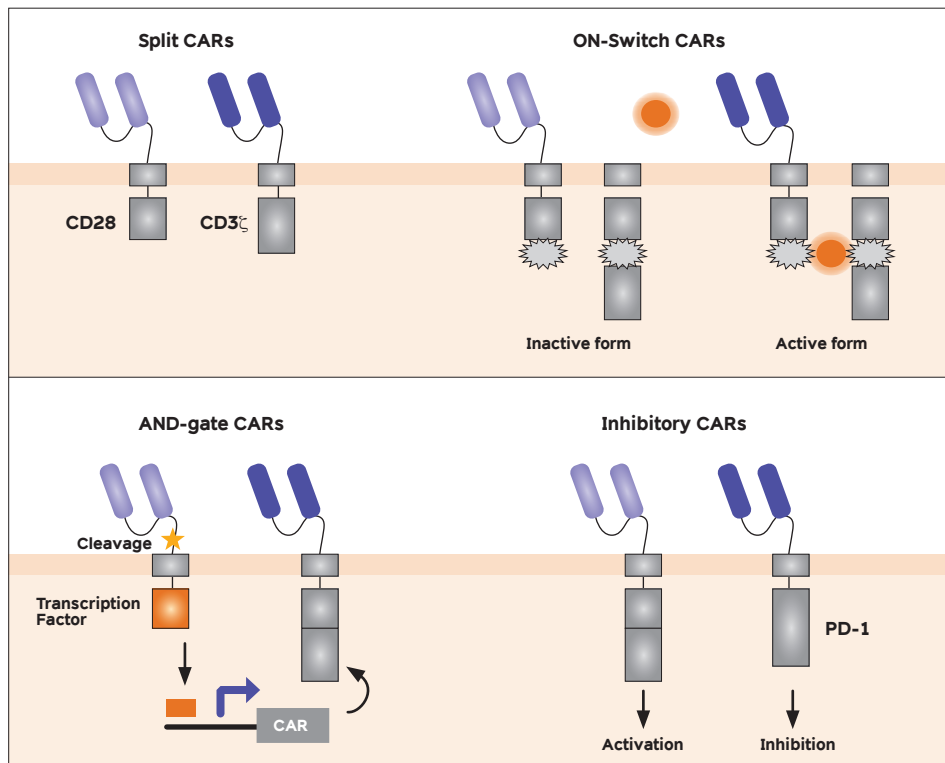


Figura 2. Nuevas estrategias en el desarrollo de CAR de nueva generación para disminuir toxicidades.

y la activación de células T de CAR y, por ende, la eliminación del tumor, solo podría ocurrir cuando ambos antígenos diana están presentes⁴⁶. Sin embargo, la pérdida del primer antígeno, que es reconocido por el receptor sintético Notch, puede dar como resultado un escape inmunológico. Este hecho, junto con una cinética de activación lenta al darse la expresión del CAR en un segundo paso, son las principales limitaciones de este enfoque.

Otra tecnología de nueva generación son los "inhibitory CAR" (iCAR), los cuales incorporan la región de señalización de un receptor de inhibición (como pueden ser el PD-1 o el CTLA-4) para limitar la toxicidad en células diana no tumorales. Esta nueva estrategia consiste en la expresión de un CAR convencional junto con un iCAR en la misma célula T. El reconocimiento del antígeno diana por el iCAR restringe la activación de las células T, mientras que la ausencia de este antígeno permite la activación de las células CAR-T⁴⁷. En este contexto, el desafío de esta tecnología es encontrar antígenos

con un patrón de expresión óptimo. En primer lugar, el iCAR debe estar dirigido frente a un antígeno que se exprese estrictamente en las células normales, mientras que el CAR convencional debería reconocer un antígeno específicamente expresado en las células tumorales, dejando patente la dificultad de dicha estrategia.

Conclusiones

- Una de las limitaciones en la terapia CAR-T son las toxicidades relacionadas con el tratamiento.
- La optimización del diseño del CAR (humanización de la scFv, elección óptima de la región coestimuladora) es necesario para disminuir las toxicidades relacionadas con el tratamiento.
- Existen medidas de seguridad para eliminar las células CAR-T en caso de toxicidades. Estas medidas incluyen la incorporación de genes marcadores (EGFRt) o bien genes suicidas (iCasp9) al transgén CAR.
- Existen diversas estrategias en el desarrollo de los CAR de nueva generación para reducir las toxicidades relacionadas con el tratamiento como son: células CAR-T de baja afinidad, Split CAR, ON-switch CAR, AND-gate CAR y los iCAR.

Nuevas estrategias para abordar el escape inmunológico

La pérdida parcial o total del antígeno diana es uno de los mecanismos de escape inmunológico mejor descritos en la terapia con células CAR-T. De hecho, a pesar de las altas tasas de respuesta inicial observadas, el escape inmunológico ha sido reportado en una proporción notable de pacientes tratados con células CAR-T. Por ejemplo, en el caso del CD19 CAR-T, se ha mostrado que entre el 7 y el 28% de los pacientes tratados han recaído con pérdida de expresión del antígeno diana (recaídas CD19-) ⁴⁸. Los mecanismos de pérdida del antígeno CD19 incluyen mutaciones y *splicing* alternativos del gen CD19, así como el cambio de células tumorales de linaje linfocítico (célula B) a uno mielocítico de expresión negativa para CD19 ¹⁹. En el contexto del mieloma, dos ensayos clínicos han mostrado la pérdida o descenso en los niveles de expresión de

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

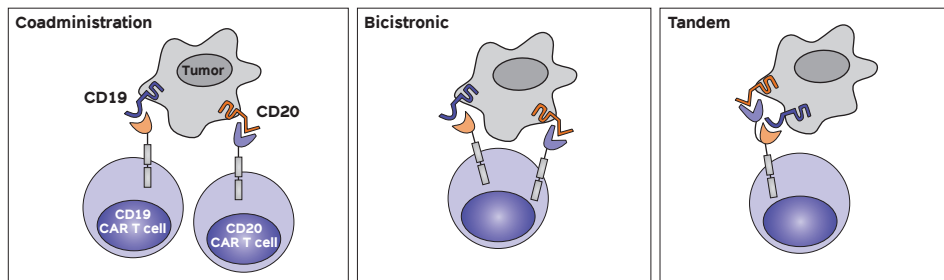


Figura 3. Nuevas estrategias en el desarrollo de CAR de nueva generación para abordar el escape inmunológico (modificada de Shah ⁵⁰).

BCMA en células residuales de mieloma tras la administración de BCMA CAR-T, pero en este caso se necesitan más estudios para comprender mejor los mecanismos de escape inmunológicos^{20,21}.

Actualmente, diversas estrategias están tratando de abordar dicha problemática. La generación de células CAR-T dirigidas a múltiples antígenos constituye una opción terapéutica para afrontar el escape inmunológico y reducir así las tasas de recaída^{19,48-50} (**Figura 3**). Dichas estrategias consisten, por un lado, en la combinación de diferentes productos de células CAR-T preinfusión (coadministración de dos o más productos diferentes de células CAR-T donde cada CAR va dirigido frente a un antígeno diana), o bien transduciendo la misma célula T con dos construcciones CAR completas dirigidas frente a diferentes antígenos (“bicistronic CAR”). Alternativamente, las células CAR-T biespecíficas, llamadas también “tandem CAR”, consisten en diseñar una construcción CAR única con dos (o más) dominios de unión a antígeno diferentes. Un factor importante en el diseño de este tipo de CAR de nueva generación es la longitud del transgén. En este sentido, las células “tandem CAR”, que tienen una longitud del transgén más pequeña, muestran una ventaja en comparación con las células “bicistronic CAR”. Por otro lado, las células “tandem CAR” necesitan una optimización del diseño que incluya la secuencia de enlace entre las regiones VH y VL de ambos scFv, el tamaño del espaciador y la orientación VH-VL dentro de ambos scFv para lograr el reconocimiento de antígenos y, por tanto, la activación de las células CAR-T deseada⁵¹.

Actualmente están en curso numerosos ensayos clínicos diseñados para evaluar estrategias con el objetivo de evitar o retrasar el escape inmunológico del antígeno CD19 asociado al uso de células CAR-T, incluyendo el reconocimiento conjunto de CD19 y CD20 (NCT03398967 y NCT03019055) o CD19 y CD22 (NCT03614858, NCT03593109, NCT03468153, NCT03448393, NCT03398967, NCT03330691,

NCT03289455, NCT03287817, NCT03241940 y NCT03233854). En el contexto del mieloma, Yan *et al*⁴² en 2019, evaluaron la eficacia y seguridad de la coinfusión de células CD19 y BCMA CAR-T en pacientes con mieloma múltiple refractario o en recaída (NCT 03455972). Los diferentes productos de células CAR-T se administraron conjuntamente a los pacientes entre los días 14 y 20 tras trasplante autólogo. Los resultados mostraron una respuesta global del 92,6% con 11/28 (40,7%) pacientes en remisión completa o remisión completa estricta, 8/28 (29,6%) pacientes en muy buena respuesta parcial y 5/28 (18,5%) en respuesta parcial. La mediana de supervivencia global fue de 16 meses. Se observó síndrome de liberación de citocinas en 19 (67,9%) pacientes, siendo grados 1 y 2. Sin embargo, en este contexto, se necesita un seguimiento más prolongado para evaluar el alcance de la eficacia de la administración conjunta de productos CAR-T. Aunque el mecanismo exacto del efecto de estas coadministraciones sigue sin estar claro, ampliar la cobertura de antígenos diana podría conducir a un mejor reconocimiento de las células de mieloma mejorando la duración de las respuestas. Sin embargo, cabe destacar que la infusión conjunta de dos productos de células CAR-T podría reducir el escape inmunológico, a expensas de un posible aumento de las toxicidades como resultado de dirigir la respuesta inmune de forma simultánea a dos o más antígenos. Más estudios con una cohorte más grande de pacientes son necesarios para hacer conclusiones. Varios ensayos clínicos están evaluando la coinfusión de células CD38 CAR-T con células CD19 (NCT03125577) y BCMA (NCT03767751) CAR-T, pero aún no se han reportado resultados.

Conclusiones

- El escape inmunológico es una de las principales limitaciones de la terapia CAR-T.
- La pérdida parcial o total del antígeno diana es uno de los mecanismos de escape inmunológico mejor descritos en la terapia con células CAR-T.
- La generación de células CAR-T dirigidas a múltiples antígenos constituye una opción terapéutica para afrontar el escape inmunológico y reducir así las tasas de recaída^{19,48,49}.

Nuevas estrategias para abordar la presencia de proteínas solubles

En la actualidad se han reportado resultados controvertidos en referencia al posible efecto de antígenos diana solubles sobre las células CAR-T, de forma que aún se desconoce si la eficacia de dichas células modificadas puede verse comprometida. Esta controversia ha sido más notoria en el contexto del mieloma múltiple, donde numerosos antígenos diana, como son el CD38, CD138 y BCMA, son escindidos de la superficie celular tumoral y liberados al torrente sanguíneo. De entre todos ellos, el antígeno diana más utilizado y que ha reportado mejores resultados hasta ahora en la terapia con células CAR-T es BCMA. Se ha descrito que BCMA puede encontrarse en la superficie de la célula de mieloma (BCMA de membrana) y además, puede liberarse de dichas células al suero de los pacientes como consecuencia de la escisión por su dominio transmembrana mediada por la γ -secretasa⁵³. De modo que el reconocimiento entre las células CAR-T y las células tumorales puede verse obstaculizado por la proteína BCMA soluble (sBCMA) como resultado de reducir la densidad antigénica de BCMA en la superficie de las células tumorales, así como la posibilidad de bloquear el CAR debido a la unión con sBCMA. El bloqueo de la escisión de BCMA de la membrana celular podría ser una estrategia interesante para evitar la liberación de BCMA como proteína soluble. En este sentido, Pont *et al*⁵⁴ han publicado recientemente que la exposición a inhibidores de la γ -secretasa (GSI, por sus siglas en inglés) bloquea eficazmente la liberación de BCMA de las células de mieloma. En consecuencia, un aumento en la expresión de proteína BCMA de membrana en las células de mieloma es observado, lo que conduce a una mayor capacidad anti-tumoral de las células BCMA CAR-T, así como una mejor proliferación y producción de citocinas en modelos preclínicos. Los pacientes con mieloma refractario con expresión baja o disminuida del antígeno diana después de haber sido tratados con tratamientos dirigidos frente a BCMA podrían beneficiarse de esta nueva estrategia. Sin embargo, se debe definir una dosis óptima de GSI para evitar efectos adversos sobre la función de las células CAR-T ya que la inhibición de γ -secretasa no perjudica la viabilidad o la actividad citolítica de las células BCMA CAR-T, pero reduce la producción de IL2 y la proliferación de dichas células⁵⁴. Por el contrario, algunos estudios han reportado que las células BCMA CAR-T no son inhibidas por la proteína BCMA soluble^{55,56}. Una posible explicación al hecho de que algunos BCMA CAR no se vean afectados por la proteína soluble BCMA podría ser la inaccesibilidad del epítipo diana debido al plegamiento de dicha proteína soluble en condiciones fisiológicas. De hecho, datos de tres ensayos clínicos destacan la ausencia de correlación entre las concentraciones de sBCMA y el grado de respuesta^{21,57,58}. Como se ha mencionado anteriormente, la escisión del antígeno diana no es exclusiva

de la proteína BCMA, muchos otros antígenos diana se liberan de las células tumorales, y se ha demostrado también en estos casos que las células CAR-T mantienen su capacidad citotóxica en presencia de proteínas solubles⁵⁹. Por lo tanto, la selección del dominio de unión al antígeno diana es un factor clave en el diseño del CAR.

Conclusiones

- Existen resultados controvertidos en referencia al efecto de la proteína diana soluble sobre la eficacia de las células CAR-T.
- Numerosos antígenos diana son escindidos de la superficie celular tumoral y liberados al torrente sanguíneo, como ocurre con la proteína BCMA.
- Algunos BCMA CAR se han visto afectados por la presencia de sBCMA en el suero de pacientes, aunque datos de tres ensayos clínicos destacan la ausencia de correlación entre las concentraciones de sBCMA y el grado de respuesta.
- El uso de inhibidores de la γ -secretasa bloquea eficazmente la liberación de BCMA de las células de mieloma.
- La selección del dominio de unión al antígeno diana es un factor clave en el diseño del CAR para limitar los posibles efectos de la proteína diana soluble sobre la eficacia de las células CAR-T.

Nuevas estrategias para aumentar la persistencia de las células CAR-T

El aumento del número de pacientes tratados con células CAR-T ha expuesto otra de las limitaciones observadas en esta terapia: la insuficiente persistencia de las células CAR-T *in vivo*. Al contrario de lo que ocurre en la LLA, donde las recaídas con pérdida de expresión del antígeno CD19 llegan a ser del 28%⁴⁸, en la mayoría de los actuales ensayos clínicos en mieloma han reportado recaídas BCMA+ resaltando una pérdida de eficacia de las células BCMA CAR-T frente a células plasmáticas malignas⁶⁰. Esta pérdida de eficacia podría ser consecuencia de la persistencia limitada de las células CAR-T *in vivo*. Hoy en día, la mayoría de los productos de células CAR-T se generan a

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

partir de células T autólogas del mismo paciente¹⁹. Aunque esta terapia celular personalizada ha reportado un notable éxito en ensayos clínicos, la generación de células CAR-T autólogas presenta varias limitaciones. El primer factor limitante es la obtención de un número adecuado de células T de pacientes con cáncer que comúnmente presentan linfopenia debido a enfermedades o tratamientos previos. Además, la generación de células CAR-T autólogas es un procedimiento largo en el cual la progresión de la enfermedad podría ocurrir durante la fabricación del producto celular en pacientes hematológicos en etapas avanzadas.

Un enfoque prometedor para aumentar la persistencia de las células CAR-T en pacientes es el uso de productos celulares que contengan una mayor frecuencia de subtipos menos diferenciados de células T, como las células T naïve (TN), las células T *stem* de memoria (TSCM) y las células T de memoria central (TCM), que presentan una capacidad de proliferación superior⁶¹. En comparación con los productos convencionales de células CAR-T, las células CAR-T menos diferenciadas han demostrado una mayor proliferación y capacidad citotóxica en estudios preclínicos. Para generar células CAR-T menos diferenciadas, se han desarrollado varias estrategias, como la preselección de los subtipos TN/TSCM o la fabricación en presencia de inhibidores de la quinasa^{61,62}. Como ejemplo, Shah *et al*⁶³ han llevado a cabo un ensayo clínico para evaluar las células CAR-T de última generación (bb21217) utilizando el mismo constructo que bb2121 pero con un enfoque novedoso basado en el empleo del inhibidor de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) bb007 durante la expansión *ex vivo* para enriquecer el producto de células CAR-T en células T de memoria. Hasta la fecha, se ha observado una respuesta global y un perfil de toxicidad similar al producto bb2121⁶⁴. Sin embargo, es necesario un seguimiento más prolongado para sacar conclusiones.

Otra estrategia podría ser definir la relación CD4:CD8 en el producto de células CAR-T. En este sentido, se han observado aumentos en la expansión de las células CAR-T y menores toxicidades en pacientes después de la infusión de una proporción 1:1 de células CAR-T^{65,66}.

La expansión y la persistencia *in vivo* de las células CAR-T también podrían verse afectadas por el protocolo de linfodepleción. De hecho, la eliminación de los linfocitos autólogos del paciente tiene varios objetivos como son, por un lado, disminuir la posibilidad de generar una respuesta inmune contra el CAR y, por otro lado, permitir que las células CAR-T modificadas se expandan en un ambiente linfopénico con altos niveles de citocinas como IL7 e IL15 y sin competencia con otros linfocitos⁶⁷. A pesar de que algunos estudios han informado que la linfodepleción no es necesaria para la expansión de las células CAR-T *in vivo*, el nivel de expansión y, por lo tanto, los resultados clínicos

de los pacientes tratados con CAR, mejora en aquellos pacientes que se sometieron a un tratamiento previo de linfodepleción. Se han utilizado diferentes protocolos de linfodepleción; no obstante, el régimen más utilizado hasta ahora es la combinación de ciclofosfamida y fludarabina.

Las productos CAR-T en la mayoría de los ensayos clínicos derivan de células T autólogas del propio paciente, debido a que el uso de células CAR-T alogénicas podrían inducir la enfermedad de injerto contra receptor (EICR). En este contexto, los aloantígenos del huésped pueden ser reconocidos mediante el TCR de las células CAR-T alogénicas. Por otro lado, el sistema inmunitario del huésped podría atacar a las células CAR-T alogénicas infundidas debido a la disparidad del antígeno leucocitario humano (HLA) resultando, en última instancia, en la eliminación de las células CAR-T alogénicas. La fabricación de células CAR-T autólogas es un proceso complejo, logísticamente desafiante, que incluye múltiples pasos como son el aislamiento y selección de células T, transducción, expansión y reinfusión en pacientes. Además, la mayoría de los pacientes se encuentran en una etapa avanzada de la enfermedad donde han recibido numerosas líneas de tratamientos tóxicos, que debilitan aún más la calidad de las células T y, por lo tanto, reducen su respuesta inmune frente a las células tumorales. De modo que la calidad de las células T a partir de las cuales se generan las células CAR-T tiene también una relevancia significativa en la expansión y persistencia de las células CAR-T, y por ende, en la capacidad antitumoral. Las células CAR-T autólogas son específicas del paciente, haciendo que el coste del producto final sea alto. Los productos alogénicos de células CAR-T generados a partir de donantes sanos pueden abordar estas desventajas permitiendo la producción de grandes cantidades de productos estandarizados. Sin embargo, modificaciones genéticas adicionales son necesarias para crear células CAR-T alogénicas. Estas modificaciones genéticas consisten, por un lado, en anular la expresión del TCR endógeno utilizando tecnología de edición génica como CRISPR/Cas9 y TALEN con el objetivo de limitar el riesgo de EICR y, por otro lado, en la incorporación de un elemento de seguridad junto con el gen CAR como medida de seguridad frente a toxicidades^{68,69}. Por el contrario, la supresión de la expresión de HLA de clase I es una estrategia novedosa que se está evaluando para evitar la eliminación de las células CAR-T alogénicas por el sistema inmunitario del huésped⁷⁰. En este sentido, los avances en las técnicas de edición génica están conduciendo a un nuevo escenario en la terapia con células CAR-T que da como resultado el desarrollo de células CAR-T universales a partir de donantes alogénicos sanos. A este respecto, la infusión de células CD19 CAR-T universales en dos pacientes pediátricos con LLA indujo respuestas completas en ambos pacientes, lo que demuestra la viabilidad de este enfoque⁷¹. En el contexto del mieloma, también se han reportado

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

algunos resultados preclínicos de células BCMA CAR-T alogénicas de segunda generación (ALLO-715) con scFv completamente humanizado⁷² (163). En este estudio, los autores, después de la transducción, transfectaron células CAR-T con ARN mensajero de TALEN con el objetivo de interrumpir específicamente los genes CD52 y cadena α del TCR, lo que resultó en una inmunidad de las células CAR-T al tratamiento de linfodepleción anti-CD52, así como a la prevención de EICR respectivamente, sin comprometer la citotoxicidad mediada por CAR. Además, este ALLO-715 BCMA CAR incorpora un interruptor de seguridad sensible a rituximab. De modo que actualmente se está llevando a cabo un ensayo de fase I para evaluar la seguridad y la eficacia del producto ALLO-715.

La herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 constituye una prometedora tecnología para generar células CAR-T de nueva generación ofreciendo una amplia gama de productos CAR-T, como por ejemplo células CAR-T más potentes al suprimir genes inhibidores, células CAR-T universales mediante la eliminación de TCR y HLA endógenos, células CAR-T controlables al incluir elementos inducibles o genes suicidas y células CAR-T en las cuales se ha eliminado la expresión del antígeno diana para evitar un posible efecto fratricida. Sin embargo, la principal barrera que presenta dicha tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 son las toxicidades por cortes inespecíficos. Estas toxicidades pueden provocar consecuencias perjudiciales no deseadas, como la activación de oncogenes o la eliminación de genes supresores de tumores⁷³. Para superar esta limitación se han explorado varios enfoques: optimizar el diseño de sgRNA y la actividad Cas9, ensayos previos de detección de cortes inespecíficos y la cuidadosa selección del sitio diana^{74,75}. Por lo tanto, se requiere una comprensión más profunda de los posibles efectos tóxicos de la edición génica en las células CAR-T.

Finalmente, para garantizar un control adecuado de la respuesta de las células T, existen varios receptores, como PD-1, TIM-3, LAG-3 y CTLA-4, que envían señales inhibitorias a las células T. La expresión de estos receptores inhibitorios en las células CAR-T provoca el agotamiento de las células T. Estudios recientes han mostrado que las células tumorales pueden aprovechar estos receptores inhibidores de las células T para evadir la respuesta inmune. A modo de ejemplo, Wherry *et al*⁶ reportaron un aumento de la expresión del ligando de PD-1 en las células tumorales causando una reducida respuesta inmune. Las estrategias terapéuticas diseñadas específicamente para inhibir estas señales inhibitorias mediante inhibidores de punto de control inmunitario, como anti-PD-1 y anti-CTLA-4, han presentaron resultados prometedores en el tratamiento de tumores sólidos además de neoplasias hematológicas⁷⁷. Estos resultados

han llevado a diseñar CRISPR/Cas9 frente a los genes de dichos receptores inhibitorios con el objetivo de interrumpirlos en las células CAR-T. Algunos estudios indican una mejora en la eficacia anti-tumoral de estas células CAR-T modificadas⁷⁸.

Conclusiones

- Otra de las limitaciones observadas en la terapia CAR-T es la insuficiente persistencia de las células CAR-T *in vivo*.
- Un enfoque prometedor para aumentar la persistencia de las células CAR-T en pacientes es el uso de productos celulares que contengan una mayor frecuencia de subtipos menos diferenciados de células T (TN/TSCM).
- Las productos CAR-T en la mayoría de los ensayos clínicos derivan de células T autólogas del propio paciente, debido a que el uso de células CAR-T alogénicas podría inducir EICR.
- Mediante técnicas de edición génica, se están desarrollando células CAR-T universales a partir de donantes alogénicos sanos en los que se suprime la expresión de TCR y HLA.

Bibliografía

1. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Med J*. 2015;6:e0004.
2. Riddell SR, et al. Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer J*. 2014;20:141-4.
3. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:525-41.
4. Harris DT, Kranz DM. Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37:220-30.
5. Zhou G, Levitsky H. Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:124187.
6. Gill S, Kalos M. T cell-based gene therapy of cancer. *Trans Res*. 2013;161:365-79.
7. Guest RD, et al. The Role of Extracellular Spacer Regions in the Optimal Design of Chimeric Immune Receptors. *J Immunother*. 2005;28:203-11.
8. James SE, et al. Antigen Sensitivity of CD22-Specific Chimeric TCR Is Modulated by Target Epitope Distance from the Cell Membrane. *J Immunol*. 2008;180:7028-38.
9. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res*. 2015;3:125-35.
10. Hudecek M, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19:3153-64.
11. Srivastava S, Riddell S.R. Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol*. 2015;36:494-502.
12. Han EQ, Li XL, Wang CR, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: Progress and challenges. *J Hematol Oncol*. 2013;6:47.
13. Kowolik CM, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*. 2006;66(22):10995-1004.
14. Shen CJ, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFR^{III} expressing glioma. *J Hematol Oncol*. 2013;6:33.
15. Quintarelli C, et al. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology*. 2018;7:e1433518.
16. Pegram HJ, Park JH, Brentjens RJ. CD28z CAR and armored CAR. *Cancer J*. 2014;20:12733.
17. Van Der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14:499-509.
18. Milone MC, Bhoj VG. The Pharmacology of T Cell Therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:210-21.
19. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17:147-67.
20. Cohen AD, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest*. 2019;129:2210-21.
21. Brudno JN, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-Cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2018;36:2267-80.
22. Raje N, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380:1726-37.
23. Mailankody S, et al. JCARH125, Anti-BCMA CAR T-cell Therapy for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Initial Proof of Concept Results from a Phase 1/2 Multicenter Study (EVOLVE). *Blood*. 2018;132:957.
24. Mailankody S, et al. Clinical Responses and Pharmacokinetics of MCARH171, a Human-Derived Bcma Targeted CAR T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Final Results of a Phase I Clinical Trial. *Blood*. 2018;132:959.
25. Jonnalagadda M, et al. Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol Ther*. 201;23:757-68.
26. Salter AI, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal*. 2018;11:pii: eaat6753.
27. Zhao Z, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*. 2015;28:415-28.
28. Wang X, et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 2011;118:1255-63.
29. Paszkiewicz PJ, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest*. 2016;126:4262-72.
30. Philip B, et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood*. 2014;124:1277-87.
31. Clackson T, et al. Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers

- with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10437-42.
32. Straathof KC, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005;105:4247-54.
 33. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a 'safety switch' to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T-cells. *Front Pharmacol*. 2014;5:1-7.
 34. Di Stasi A, et al. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *N Engl J Med*. 2011;365:1673-83.
 35. Lamers CHJ, Klaver Y, Gratama JW, Sleijfer S, Debets R. Treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with CAIX CAR-engineered T-cells - A completed study overview. *Biochem Soc Trans*. 2016;44:951-9.
 36. Kalos M, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2011;3(95):95ra73.
 37. Kochenderfer JN, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012;119(12):2709-20.
 38. Kochenderfer JN, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 2010;116:4099-102.
 39. Caruso HG, et al. Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity. *Cancer Res*. 2015;75:3505-18.
 40. Song DG, et al. A fully human chimeric antigen receptor with potent activity against cancer cells but reduced risk for off-tumor toxicity. *Oncotarget*. 2015;6:21533-46.
 41. Drent E, et al. A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Mol Ther*. 2017;25(8):1946-58.
 42. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: A (r) evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res*. 2001;25:1-12.
 43. Lanitis E, et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res*. 2013;1:43-53.
 44. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*. 2013;31:71-5.
 45. Wu CY, Roybal KT, Puchner, EM, et al. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 2015;350:aab4077.
 46. Roybal KT, et al. Precision Tumor Recognition by T Cells with Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*. 2016;164:770-9.
 47. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*. 2013;5:215ra172.
 48. Song MK, Park BB, Uhm JE. Resistance Mechanisms to CAR T-Cell Therapy and Overcoming Strategy in B-Cell Hematologic Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2019;20:pii: E5010.
 49. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus MV. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;12:145-56.
 50. Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Front Oncol*. 2019;9:146.
 51. Zah E, Lin MY, Anne SB, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4:498-508.
 52. Yan L, et al. Sequential CD19- and Bcma-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cell Treatment for RRMM: Report from a Single Center Study. *Blood*. 2019;134:578.
 53. Sanchez E, et al. Soluble B-cell maturation antigen mediates tumor-induced immune deficiency in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2016;22:3383-97.
 54. Pont MJ, et al. γ -Secretase inhibition increases efficacy of BCMA-specific chimeric antigen receptor T cells in multiple myeloma. *Blood*. 2019;134:1585-97.
 55. Friedman KM, et al. Effective Targeting of Multiple B-Cell Maturation Antigen-Expressing Hematological Malignancies by Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Hum Gene Ther*. 2018;29:585-601.
 56. Carpenter RO, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2048-60.
 57. Berdeja JG, et al. Durable Clinical Responses in Heavily Pretreated Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Multicenter Study of bb2121 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy. 2017.
 58. Cohen AD, et al. Safety and Efficacy of B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-BCMA) with Cyclophosphamide Conditioning for Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood*. 2017;130:505.
 59. Sun C, et al. Safety and efficacy of targeting CD138 with a chimeric antigen receptor for the treatment of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2019;10:2369-83.
 60. Agostino MD, Rajee N. Anti-BCMA CAR T-cell therapy in multiple myeloma : can we do better? *Leukemia*. 2020;34:21-34.

Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro

61. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 2017;545:423-31.
62. Petersen CT, et al. Improving T-cell expansion and function for adoptive T-cell therapy using ex vivo treatment with PI3Kd inhibitors and VIP antagonists. *Blood Adv*. 2018;2:210-23.
63. Shah N, et al. Initial Results from a Phase 1 Clinical Study of bb21217, a Next-Generation Anti Bcma CAR T Therapy. *Blood*. 2018;132:488.
64. Berdeja JG, et al. Updated Results from an Ongoing Phase 1 Clinical Study of bb21217 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy. *Blood*. 2019;134:927.
65. Turtle CJ, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126:2123-38.
66. Green DJ, et al. Fully Human Bcma Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells Administered in a Defined Composition Demonstrate Potency at Low Doses in Advanced Stage High Risk Multiple Myeloma. *Blood*. 2018;132:1011.
67. McLellan AD, Ali Hosseini Rad S M. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation. *Immunol Cell Biol*. 2019;97:664-74.
68. Valton J, et al. A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy. *Mol Ther*. 2015;23:1507-18.
69. Bailey SR, Maus MV. Gene editing for immune cell therapies. *Nat Biotechnol*. 2019;37:1425-34.
70. Ren J, et al. Multiplex genome editing to generate universal CART cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017;23:2255-66.
71. Qasim W, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017;9:pii eaaj2013.
72. Sommer C, et al. Preclinical Evaluation of Allogeneic CAR T Cells Targeting BCMA for the Treatment of Multiple Myeloma. *Mol Ther*. 2019;27:1126-38.
73. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J*. 2016;283:1218-31.
74. Liu J, Zhou G, Zhang L, Zhao Q. Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing. *Front Immunol*. 2019;10:456.
75. Li H, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:1-23.
76. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:486-99.
77. Carbone DP, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376:2415-26.
78. Mollanoori H, Shahraki H, Rahmati Y, Teimourian S. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human Immunol*. 2018;79:876-82.

Con el aval científico de:



Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia

Con la colaboración de:



FISEVI
Fundación Pública Andaluza para la
Gestión de la Investigación en
Salud de Sevilla



GILEAD
Advancing Therapeutics.
Improving Lives.



Bristol Myers Squibb™

Celgene | A Bristol Myers Squibb Company