

## **Nuevas aplicaciones de edición génica a la terapia celular adoptiva para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda**

### **New applications of gene editing to adoptive cell therapy for the treatment of acute myeloid leukemia**

*Andrey Montero-Bonilla*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social, Costa Rica.

<sup>2</sup>Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), Costa Rica.

Correspondencia: ramonterob@ccss.sa.cr

Recibido: 04/04/2022; aceptado para publicación: 24/04/2022.

#### **Resumen**

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una malignidad con severas complicaciones en pacientes en recaída y enfermedad refractaria. Para estos, los avances en tratamiento han sido escasos en las últimas tres décadas reduciéndose en muchos casos al trasplante de células madre hematopoyéticas, sin embargo, su uso es limitado.

La terapia celular adoptiva ha presentado grandes avances para el tratamiento del cáncer. Algunos inconvenientes como el tiempo de generación del producto terapéutico y la dificultad para obtener componentes celulares adecuados posterior a la quimioterapia, han mejorado de manera acelerada con la aparición de modelos de edición génica. Estos se enfocan en editar los receptores de linfocitos T así como algunas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) logrando que estas terapias sean más accesibles, seguras y estén disponibles a tiempo para los pacientes.

En esta revisión, se realiza una aproximación a los principales inconvenientes que se presentan en el tratamiento de LMA, las nuevas aproximaciones con inmunoterapia celular adoptiva y herramientas de edición génica, así como las perspectivas futuras.

#### **Palabras clave**

CAR-T, LMA, linfocito T, trasplante de células madre, terapia génica, inmunoterapia, CD33, alogénico, CRISPR.

#### **Abstract**

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignancy with severe clinical complications in patients refractory to treatment or who develop a relapse. Advances in treatment have

been limited in the last three decades, with hematopoietic stem cell transplantation as the alternative for these patients; however, not all patients are candidates for this treatment, and sometimes, its access is limited.

Adoptive cell therapy has recently emerged as a potentially curative therapy in this type of cancer, and ongoing research is showing encouraging results. Nevertheless, some issues such as the time to generate therapeutic products, and the lack of adequate cell components after chemotherapy, make this therapeutic option difficult. To overcome these obstacles, new gene editing methods, focused on T cell receptors as well as Major Histocompatibility Complex (MHC), are improving these new therapeutical options, making them safe and available for patients.

In this review, we summarize the important issues driven by AML, new potential immunotherapies, gene editing tools, and address the present and future of research in this field.

### **Keywords**

CAR-T, AML, gene therapy, T lymphocyte, stem cell transplant , immunotherapy, CD33, allogeneic, CRISPR

### **Introducción**

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una malignidad que presenta alteraciones genéticas en células madre de precursores mieloides y representa casi un tercio de todos los casos de leucemias. Su incidencia se incrementa en etapas avanzadas de la vida, principalmente en personas mayores de 65 años con una tasa de curación de 5-15% en este grupo y 35-40% en personas jóvenes (1–3).

El tratamiento para LMA consiste en una primera fase de inducción, con ciclos de quimioterapia con los que se busca la remisión completa (RC). En una segunda fase de consolidación, en pacientes con riesgo intermedio y alto es recomendado realizar el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico (4,5). Los criterios para clasificar a este grupo se basan principalmente en la presencia de Nucleofosmina 1 (NPM1), la tirosina kinasa FLT3 (del inglés Fms Like Tyrosine Kinase 3), así como algunas inversiones y traslocaciones específicas como lo son trisomía 8, traslocación (9;11), inversión del cromosoma 3, traslocación (6;9) o (9;22) y cariotipos complejos

con más de 3 anormalidades citogenéticas. Por último, se presenta una tercera fase de mantenimiento con agentes quimioterapéuticos a dosis variables (4,5).

Actualmente, más del 30% de los adultos diagnosticados no alcanzan la RC posterior a dos ciclos de quimioterapia, excluyéndolos de la posibilidad de recibir el TCMH y haciendo que para esta población exista una gran limitación de opciones terapéuticas (6). Adicionalmente, el deterioro inmunológico de los pacientes debido a la poca tolerancia a la quimioterapia, las comorbilidades y la escasa disponibilidad de donantes compatibles en el momento de establecer la terapia limitan su aplicación en muchos casos (7,8).

En esta revisión se describe la inmunoterapia celular adoptiva basada en modelos de linfocitos que expresan receptores quiméricos para antígenos, haciendo énfasis en las principales herramientas de edición génica en el contexto alogénico, como alternativas para el tratamiento de la LMA refractaria y en recaída.

### **El desafío del tratamiento de LMA en recaída y refractaria**

En las últimas décadas los avances en el tratamiento de la LMA en recaída y refractaria han sido escasos. Sin embargo, se han logrado desarrollar algunas opciones terapéuticas como inhibidores de FLT3, IDH1 e IDH2 así como anticuerpos monoclonales, tales como anti-CD33, anti-CD123, anti-CTLA4 y anti-PD-1/PD-L1 con cierto éxito, pero limitadas a un número muy bajo de pacientes debido a la heterogeneidad de esta patología. Por lo tanto, la recaída y enfermedad refractaria siguen sin tener opciones terapéuticas oportunas (9).

Este panorama ha generado la necesidad de explorar otras aproximaciones. Dentro de estas, el uso de linfocitos T con receptores quiméricos para antígenos (CAR-T del inglés *Chimeric antigen receptor-T cells*), es una de las más prometedoras. En general, esta

terapia ha sido muy beneficiosa en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), sin embargo, trasladar este éxito a las patologías mieloides ha llevado grandes retos como son la dificultad para encontrar antígenos específicos en las células diana (10), así como las complicaciones generadas en las patologías mieloides debido a la inmunosupresión y mieloablación, que por lo general hacen que los pacientes no sean candidatos a la terapia debido a las dificultades para obtener productos terapéuticos eficaces y por el deteriorado estado de salud que se presenta en recaídas (11).

### **Terapias con CAR-T cells: origen y evolución**

Las terapias con CAR-T han revolucionado la manera de tratar algunos tipos de cáncer, dado que pueden reconocer antígenos expresados en la superficie de células tumorales y facilitar su eliminación. Para comprender mejor su desarrollo, desde el punto de vista funcional, los modelos de CAR-T se basan en los mecanismos de activación de linfocitos T. Este mecanismo consta de tres señales que se han descrito de manera amplia, la primera señal se genera con el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T en el contexto del MHC clase I y II, posteriormente se describe una segunda señal, dada por la unión del receptor CD28 a otros receptores como CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno. Seguidamente, son activados mediante otras señales coestimuladoras y se comprometen hacia un fenotipo específico, con la producción de citoquinas específicas como tercera señal (12,13). Profundizando en esta interacción, debe comprenderse la estructura del receptor de linfocito T (TCR), el cual consta de un dominio extracelular, posteriormente dominios transmembrana y motivos intracelulares, cada uno con una función asociada que culminará con la activación de dicha célula y la respuesta adaptativa efectora (14,15).

Valiéndose de estas funciones del sistema inmune, comenzaron a desarrollarse diversas investigaciones con el objetivo de generar modelos de linfocitos T que expresaran un receptor mixto o quimérico, con un dominio extracelular que permitiera el reconocimiento del antígeno diana sin necesidad de mediación del MHC y que posteriormente fuera capaz de llevar a cabo un proceso de auto-activación, culminando con una respuesta inmune eficaz contra dicho antígeno sin la necesidad de interactuar estrictamente con coreceptores en otras células (16).

Desde una perspectiva estructural, los modelos CAR-T han sido diseñados con un dominio extracelular de reconocimiento antigénico, este suele ser un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo (scFv), un dominio transmembrana derivado generalmente de CD3, CD4, CD8 o CD28 y un dominio de señalización intracelular, generalmente la cadena CD3 $\zeta$  del receptor de linfocitos T (17–19). La porción extracelular del CAR permite el reconocimiento antigénico específico y posteriormente, los dominios de señalización estimulan la activación, derivando en lisis de la célula tumoral así como la liberación de citoquinas para generar una respuesta inmune que favorezca su eliminación (20,21). Varias generaciones de CAR-T se han desarrollado con el fin de buscar un acercamiento más profundo a estos conceptos de inmunidad que se presentan de manera natural en los individuos, desde modelos de primera generación, hasta otros más avanzados que presentan liberación de citoquinas para modelar las señales de presentación antigénica, así como modelos con inhibición de marcadores de agotamiento como PD-1. Dentro de estos, los más usados han sido los modelos de segunda generación (22).

Recientemente, varios tratamientos con terapia celular adoptiva han sido desarrollados de manera exitosa, principalmente en pacientes con neoplasias malignas hematológicas de

linfocitos B CD19+ con altas recidivas o refractarias, utilizando un CAR-T contra este antígeno, así como algunos linfomas y son en la mayoría autólogos (23). Su éxito ha llevado a la aprobación por parte de la FDA de tres de estos productos: tisagenlecleucel (Kymriah, Novartis), axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Kite Pharmaceuticals) y brexucabtagene autoleucel (Tecartus, Kite Pharmaceuticals) (24–26). Además, otras terapias han mostrado una sólida actividad antitumoral para otras neoplasias malignas hematológicas dirigidas contra antígenos como BCMA (27), CD20, CD22 y CD30 (28,29).

A pesar del potencial beneficio que ofrece esta terapia, en general, los tratamientos con CAR-T presentan algunas desventajas. Una de las principales limitantes que se ha presentado en todo el mundo es la accesibilidad, ya que los costos son elevados y muy pocos sistemas de salud son capaces de adquirirlos de manera sostenible (30). Actualmente, los precios de estas terapias comercialmente rondan los 450 000 USD. Esto ha llevado a que sean desarrolladas en diferentes centros en todo el mundo como modelos académicos y se utilicen en ensayos clínicos para ser probados con el objetivo de disminuir la brecha existente y mejorar su accesibilidad (31).

### **Surgimiento de modelos alogénicos para terapias con CAR-T**

Algunos factores adicionales han ocasionado la búsqueda de modelos de CAR-T provenientes de donantes, catalogados como modelos universales, ya que generar tratamientos con células del paciente en recaída y enfermedad refractaria presenta múltiples inconvenientes. Uno de estos es el estado clínico al momento de requerir esta terapia, ya que en muchos casos los tratamientos que se han recibido de manera previa, poseen un gran efecto tóxico en células como linfocitos T (32), por lo tanto, la recolección de estas poblaciones celulares es compleja y en muchas ocasiones no se consiguen

números adecuados para la generación del producto terapéutico. Otro aspecto es el tiempo de generación de CAR-T, este es de aproximadamente tres semanas, un período de tiempo en el cual puede presentarse un deterioro muy marcado, imposibilitando al paciente recibir la terapia oportunamente (33).

Recientemente, han aparecido nuevos enfoques que buscan generar CAR-T de donantes, fabricados previamente para que estén disponibles para ser utilizados en el momento preciso. Existen desafíos significativos en el uso de células alogénicas y estos se centran en el desajuste inmunológico entre el donante y el receptor. Sin embargo, las estrategias de CAR-T alogénicas tienen el potencial de ofrecer terapias más rápidas, eficaces y accesibles. Los avances se han desarrollado gracias a las tecnologías de edición génica, que ya han dado resultados eficaces para controlar el riesgo de enfermedad injerto versus hospedero (EIVH) al eliminar de manera eficiente la expresión de TCR y novedosas técnicas para hacer que las células no sean detectadas por el sistema inmunitario del receptor, mediante la disrupción de algunos genes que codifican por antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (34).

### **Principales dianas terapéuticas para generación de CAR-T en LMA**

Diversas moléculas como Lewis Y, CD123, CD33, CD35, CD38, CD7 y CD44 han sido estudiadas y probadas para evaluar su potencial uso en la generación de CAR-T y el tratamiento de la LMA. Sin embargo, los resultados no han sido similares a los obtenidos en otras patologías como las linfoides tipo B. CD123, por ejemplo, ha sido identificada como una potencial diana, sin embargo, es expresada también en células mieloides maduras causando mieloablación en un número alto de pacientes (11).

Una de las moléculas con mayor potencial identificadas hasta ahora es CD33, una glicoproteína expresada específicamente en precursores mieloides y poco expresada en

células mieloides maduras como granulocitos y macrófagos. Estudios recientes indican que las células tumorales expresan CD33 y son un blanco adecuado para tratamientos con terapia celular adoptiva (35,36).

### **Edición génica de TCR y HLA en linfocitos T**

Las células alogénicas editadas genéticamente tienen el potencial de actuar como efectoras universales, pueden administrarse a cualquier paciente independientemente del tipo de MHC y pueden disponerse como un tratamiento listo para ser utilizado en el momento en el cual se necesite, sin el inconveniente que presentan los modelos autólogos en cuanto al tiempo de manufactura (37,38).

Uno de los objetivos primordiales de la terapia alogénica es evitar la EIVH y el rechazo agudo de los CAR-T. Para prevenir la primera, uno de los métodos más utilizados es la disrupción del TCR, principalmente por *Knock out* (KO); esta es una estrategia de edición génica que busca eliminar la expresión de un gen determinado, por medio de ingeniería genética. Este receptor es un heterodímero con una cadena alfa y una beta, ambas deben estar presentes para que funcione de manera adecuada. De sus dos subunidades, se ha descrito que para la cadena alfa codifica únicamente un gen (TRAC) y se ha visto una mejor disminución de la expresión del TCR comparada con la disrupción del gen de cadena beta (TRBC), para el cual existen dos genes codificantes. Por lo tanto, la edición por KO de la cadena alfa es la técnica más utilizada para lograr alterar la expresión del receptor y alterar su funcionalidad (39,40).

En cuanto a las nucleasas que se emplean en estos procesos de edición, estas actúan como «tijeras moleculares» para editar el genoma, por medio de la unión específica de una guía de proteínas o de ARN a una secuencia de ADN determinada y luego el respectivo corte en esa región, un proceso en el que es necesario utilizar un dominio de nucleasa. Cuando

el ADN es cortado, se da una ruptura de doble cadena, luego se da un proceso de corrección por medio del mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ del inglés *Non-homologous end joining*). Sin embargo, este proceso es propenso a errores y al corregirse el daño, el gen se ve alterado en su secuencia original, esto culmina con una expresión deficiente o ausente (39).

En general, los métodos que utilizan nucleasas de ADN se dirigen a las regiones constantes de una o ambas subunidades del TCR (alfa y beta). Existen diversas tecnologías para edición génica de linfocitos, dentro de estas, nucleasas con dedos de zinc (ZFN), *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) y más recientemente los métodos conocidos como *prime editing* (41,42). Adicionalmente, la expresión de TCR puede interrumpirse mediante una variedad de estrategias como el bloqueo de la expresión con ARN de interferencia y las proteínas inhibidoras. Un ejemplo son los fragmentos variables de cadena única derivados de anticuerpos específicos para CD3 $\epsilon$ . Un modelo descrito recientemente, combinó un fragmento variable derivado de un anticuerpo específico para CD3 $\epsilon$  con 21 secuencias de aminoácidos diferentes predeterminadas para retenerlo intracelularmente. Después de la transducción en linfocitos T, varios de estos bloqueadores de la expresión de proteínas se colocaron intracelularmente con CD3 $\epsilon$ , bloqueando la expresión de CD3 y TCR en la superficie y reduciéndola de 95,7 % al 25,0%. Con este modelo se anuló la señalización mediada por el TCR sin afectar el inmunofenotipo y la proliferación. La expresión combinada de estos inhibidores y el CAR se puede lograr en un procedimiento de un solo paso, se adapta fácilmente a los protocolos actuales de fabricación de células y se puede usar para apuntar a otras moléculas para mejorar aún más las terapias con CAR-T (43). Se han descrito también modelos de inhibición de la expresión de manera múltiple. Estos se enfocan no

solamente en la expresión adecuada del CAR y la interrupción de moléculas de HLA y el TCR, si no que también consideran los inmunofenotipos de agotamiento que expresan los linfocitos T de manera aumentada, como PD-1 y CTLA4 (44).

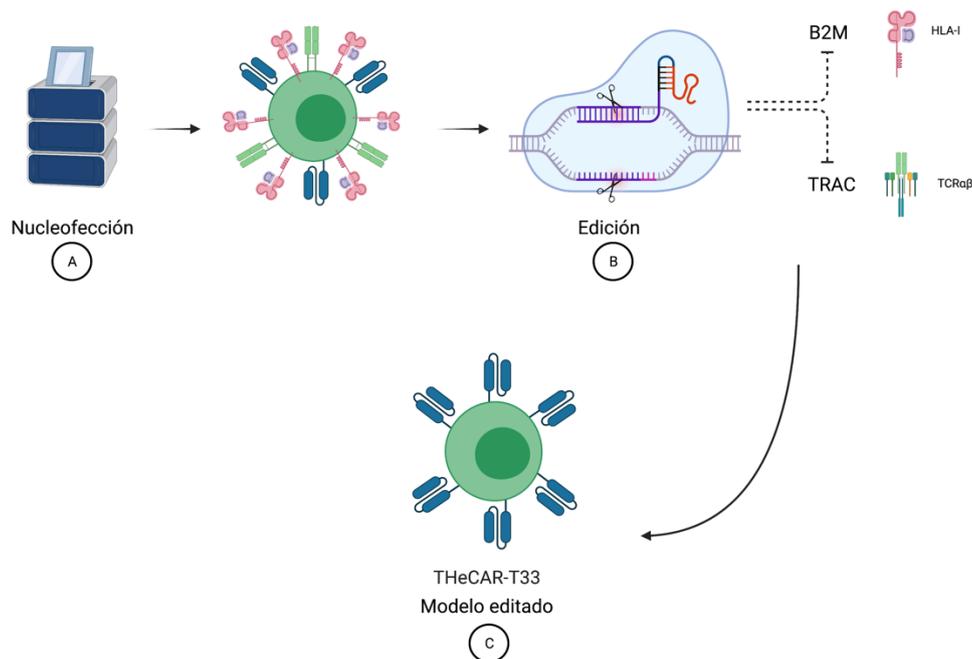
### **Sistemas CRISPR para edición de linfocitos T**

Los sistemas CRISPR han surgido recientemente como una herramienta novedosa, versátil y con gran potencial para ser utilizada en sistemas de interrupción de genes en modelos de CAR-T alogénicos (45). La tecnología CRISPR se origina en el sistema inmunitario tipo II adquirido en bacterias y arqueas. Este sistema brinda protección contra virus invasores (bacteriófagos), plásmidos y otros tipos de ácidos nucleicos extraños (46). Tras la activación de este sistema, pequeños fragmentos se cortan del ADN exógeno y se incorporan en un locus de CRISPR, específicamente entre secuencias repetidas que se codifican dentro del genoma del organismo procarionta. Estos elementos permiten que la bacteria o arquea forme «memoria» y posteriormente cuando se encuentra el mismo invasor o uno similar, puede generar segmentos de ARN que se unen de manera específica al ADN del agente y lo reconocen (47). Posteriormente, se recluta la endonucleasa de ADN (Cas9), lo que resulta en la formación de un complejo ribonucleoproteico. Esta nucleasa es guiada para cortar el ADN a un espaciador motivo-adyacente (PAM) que varía de acuerdo con el sistema CRISPR específico (48). Esta PAM, por lo tanto, es reconocida por el complejo de ribonucleoproteína CRISPR/Cas9 y se da la eliminación de ese agente exógeno (49) (figura 1).

Este método ha demostrado gran eficacia al alterar la expresión del gen que codifica por la subunidad beta 2 microglobulina (B2M) de la molécula de HLA-I, así como el gen TRAC que codifica por la subunidad alfa del TCR (50). Además, actualmente, utilizar sistemas CRISPR/Cas9 es una opción muy atractiva, principalmente debido a su bajo

costo, comparado con ZFN y TALEN (51). Sin embargo, muchos estudios actuales abordan cuestiones de seguridad, ya que también pueden presentarse efectos de corte inespecífico de ADN (52).

A pesar de que las herramientas de edición enfocadas en la reducción y eliminación de la expresión de HLA-I son consideradas seguras y adecuadas para su posterior escalada a la clínica, presentan la desventaja de que al disminuir la expresión de esta molécula, los linfocitos T serán reconocidos por las células NK y eliminados, limitando la persistencia del CAR-T. Esto debe ser considerado en futuros modelos para mejorar su efectividad (53).



**Figura 1. Modelo de nucleofección con CRISPR/Cas9 para generar un CAR-T contra CD33 editado.**

**(A)** En un paso inicial, se realiza la electroforación en condiciones específicas para lograr el ingreso de las herramientas de edición genética al núcleo de los linfocitos T. **(B)** Seguidamente en el núcleo con la herramienta CRISPR/Cas9 se editan los genes TRAC del TCR y B2M del HLA-I. **(C)** Finalmente se obtiene un producto editado genéticamente con expresión truncada de ambas moléculas en la membrana celular.

B2M: Beta-2-microglobulina; TRAC: Región constante del receptor alfa de linfocito T; TheCAR-T33: CAR-T editado para HLA y TCR contra CD33.

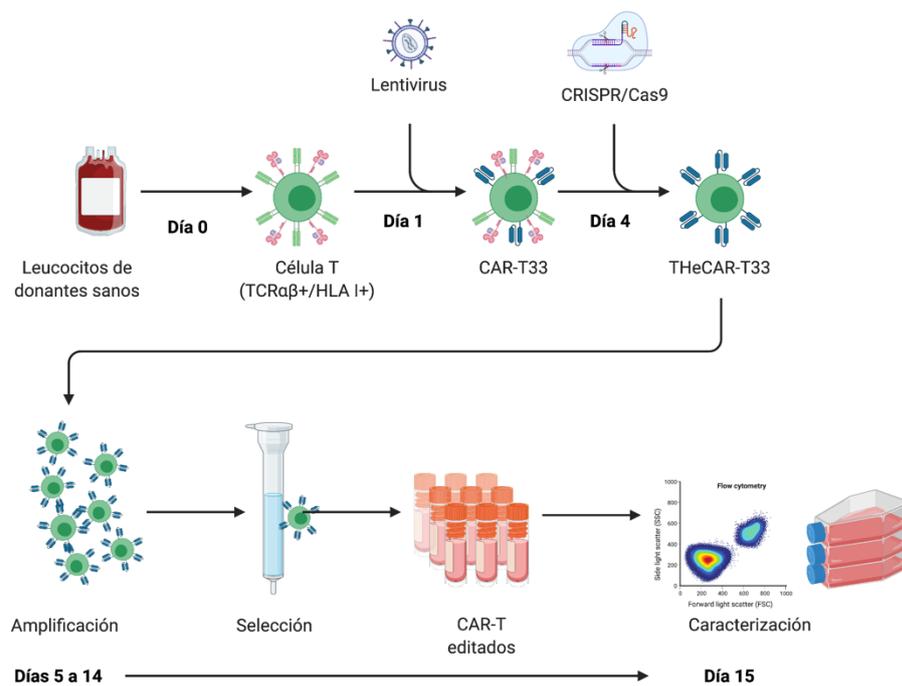
### **Modelos de CAR-T contra CD33 como potencial terapia para LMA**

Una diana de interés en LMA y en la que se está trabajando intensamente es CD33, un receptor de membrana similar a las inmunoglobulinas con función poco definida hasta el momento (54). Se ha descrito su expresión en aproximadamente el 90-95% de los casos de LMA, y no está presente en las células progenitoras multipotentes (55). Aunque se expresa en precursores mieloides comunes, sus niveles en células maduras como los granulocitos y los macrófagos son bajos, por lo que es un objetivo factible para la inmunoterapia (56).

En efecto, existen varios ensayos clínicos utilizando CD33 como un marcador diana de la inmunoterapia, no solo con células CART sino también con anticuerpos monoclonales con los cuales se ha observado un éxito en la disminución de la proliferación de blastos en LMA (57). Valiéndose de la especificidad y buen desempeño en estos ensayos, las regiones de unión a CD33 de este anticuerpo han sido clonadas en vectores virales, principalmente para posteriormente expresarse como CAR-T de segunda generación. Dichas aproximaciones han dado resultados prometedores en ensayos preclínicos y clínicos tanto alogénicos (10,58) como autólogos en fases iniciales, en los cuales se ha demostrado una adecuada actividad contra células tumorales que expresan CD33 (59–61).

Actualmente, se encuentra en desarrollo un ensayo clínico registrado en [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (NCT03971799) con un CAR-T contra CD33, generado con un vector viral para realizar su evaluación en fase I, el objetivo es determinar la máxima dosis tolerada en niños y adultos jóvenes, así como también en fase II para determinar el

porcentaje de sujetos tratados que alcanzan una remisión por morfología (<5% de blastos en médula ósea) al día 28 posterior a la infusión. Un segundo ensayo clínico (NCT01864902) busca determinar la seguridad y persistencia *in vivo* del CAR-T contra CD33. Los resultados hasta ahora no han sido publicados.



**Figura 2. Proceso global de generación de CAR-T incluyendo la edición de TCR y moléculas de HLA-I *in vitro* con sistemas CRISPR/Cas9.** Inicialmente, se obtienen linfocitos T de donantes sanos. Seguidamente se realiza una transducción con un vector integrativo, como un lentivirus que contiene el gen de interés para ser incorporado al genoma. Alrededor del día cuatro se realiza el proceso de electroporación con sistemas de edición como CRISPR/Cas9, posterior al día cinco se realiza el proceso de expansión para obtener el producto de linfocitos T editados, que es necesario caracterizar fenotípica y funcionalmente, y de esa manera se obtienen CAR-T universales.

TCRα/β: Receptor de linfocito T con las subunidades alfa y beta; CAR-T33: Modelo de CAR-T dirigido contra CD33 sin editar; THeCAR-T33: CAR-T editado para HLA y TCR contra CD33.

### **Perspectivas futuras**

Es clave la investigación de los efectos secundarios que se presentan por reconocimiento de órganos de manera inespecífica, como se ha hecho con los anticuerpos monoclonales contra CD33, que reconoce células de Kupffer causando hepatotoxicidad (62,63). También se busca la disminución del síndrome de liberación de citoquinas producida por la actividad intrínseca de los CAR-T(54,64), así como los mecanismos de resistencia que se presentan en esta terapia, con el objetivo de mejorar a futuro su desempeño a nivel clínico (65). Todo esto favorecerá el desarrollo de nuevos enfoques principalmente trasladables a otras malignidades hematológicas y tumores sólidos.

La combinación de la terapia con CAR-T para LMA también apunta a su complemento con el TCMH y con esquemas de quimioterapia con el objetivo de mejorar la eficacia, por lo tanto, la generación y aplicación en diferentes terapias es clave para mejorar la supervivencia de pacientes con LMA (66,67). Otro de los aspectos en los que se trabaja intensamente es en la disminución de los costos de manufactura y con esto aumentar el acceso a los tratamientos en países en desarrollo. En nuestra región, se hacen esfuerzos importantes en colaboración con centros internacionales para poder generar el conocimiento y las alternativas con terapia celular adoptiva que se espera den sus primeros frutos en los años venideros.

### **Conclusiones**

Es necesario explorar opciones de tratamiento alternativas en LMA, principalmente para pacientes en recaída y con enfermedad refractaria a quimioterapia. En esa dirección, la terapia celular adoptiva es una herramienta prometedora para el tratamiento de patologías hematológicas, con gran potencial para ser implementada a escala preclínica y clínica en modelos para LMA.

De manera esperanzadora, los modelos de CAR-T, tanto autólogos como alogénicos, se perfilan como terapias innovadoras para complementar el tratamiento de la LMA, de la mano de la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales y el TCMH. Sin embargo, existen múltiples aspectos de seguridad a considerar en modelos preclínicos para poder desarrollar productos terapéuticos que puedan ser evaluados en ensayos clínicos y ofrecer alternativas terapéuticas adecuadas.

Afortunadamente, el surgimiento de herramientas de edición génica seguras y accesibles como CRISPR/Cas9, ha logrado facilitar la evolución en el desarrollo de nuevas terapias rápidamente, algo que sin duda es un campo en expansión con potenciales oportunidades para desarrollar investigación y desarrollo (I+D) en nuestra región, donde existe un gran reto para poder aplicar estas terapias, ya que se carece de centros especializados para su implementación a nivel clínico, lo cual representa una oportunidad de mejora a futuro que debe ser sin duda analizada.

### **Conflictos de interés**

El autor declara no poseer conflictos de interés.

### **Figuras**

Las figuras que aparecen en esta revisión fueron creadas por el autor en su totalidad, utilizando el software BIORENDER ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### **Referencias**

1. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer Journal*. 2016; 6(7): 2016.
2. Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: Mutations, models and management. *BMC Cancer*. 2012;12.
3. Tang L, Zhang Y, Hu Y, Mei H. *Hematological Malignancies*. 2021; Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/6616391>
4. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al.

- CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020; 367(6481).
5. Kantarjian H, Kadia T, Dinardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. 2021;11:41. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00425-3>
  6. Ferguson P, Craddock C. Allogeneic transplantation in primary refractory AML. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(7):950–1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2017.61>
  7. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):340–52.
  8. Döhner, H, Weisdorf, DJ, Bloomfield CD (2015). *Acute Myeloid Leukemia*. *N Engl J Med*. 2015; 373(12):1136–1152.
  9. Pei X, Huang X. New approaches in allogeneic transplantation in AML. *Semin Hematol*. 2019; 56(2):147–54. Disponible en <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.007>
  10. Kim MY, Yu KR, Kenderian SS, Ruella M, Chen S, Shin TH, et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. 2018;173(6):1439-1453.e19.
  11. Kenderian S, Ruella M, Shestova O, Klichinsky M, Aikawa V, Morrissette J, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015; 29(8): 1637-47. Disponible en: [www.nature.com/leu](http://www.nature.com/leu)
  12. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591–619.
  13. Guerriero JL. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2019 342: 73–93. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.07.001>
  14. Saline M, Rödström KEJ, Fischer G, Orekhov VY, Karlsson BG, Lindkvist-Petersson K. The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation. *Nat Commun*. 2010;1(8).
  15. Piepenbrink KH, Blevins SJ, Scott DR, Baker BM. The basis for limited specificity and MHC restriction in a T cell receptor interface. *Nat Commun*. 2013;4:1–9.
  16. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86(24):10024–8.
  17. Almåsbak H, Aarvak T, Vemuri MC. CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment. *J Immunol Res*. 2016; 2016.
  18. Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev*. 2014; 257 (1): 56-71.
  19. Larson RC, Maus M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(3):145–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-00323-z>
  20. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential

- strategies. *Blood Cancer J.* 2021;11(4). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
21. Malissen B. CAR T cells: from tinkering to rational design. *Cell Res.* 2020;30(11):948–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-00420-6>
  22. Srivastava S, Riddell SR. Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol.* 2015; 36(8):494–502. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.06.004>
  23. Xu D, Jin G, Chai D, Zhou X, Gu W, Chong Y, et al. The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy. *Oncotarget.* 2018;9(17):13991–4004.
  24. Caldwell KJ, Gottschalk S, Talleur AC. Allogeneic CAR Cell Therapy—More Than a Pipe Dream. *Front Immunol.* 2021;11(January):1–12.
  25. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531–44.
  26. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439–48.
  27. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2019; 380(18):1726–37.
  28. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2020;382(14):1331–42.
  29. Ramos CA, Grover NS, Beaven AW, Lulla PD, Wu MF, Ivanova A, et al. Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2020;38(32):3794–804.
  30. Hay AE, Cheung MC. CAR T-cells: costs, comparisons, and commentary. *J Med Econ.* 2019;22(7):613–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/13696998.2019.1582059>
  31. Lyman GH, Nguyen A, Snyder S, Gitlin M, Chung KC. Economic Evaluation of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy by Site of Care among Patients with Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma. *JAMA.* 2020;3(4):1–14.
  32. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(4):547–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.012>
  33. Köhl U, Arsenieva S, Holzinger A, Abken H. CAR T Cells in Trials: Recent Achievements and Challenges that Remain in the Production of Modified T Cells for Clinical Applications. *Hum Gene Ther.* 2018;29(5):559–68.
  34. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(3):185–99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0051-2>
  35. Paolo Tambaro F, Singh H, Jones E, Rytting M, Mahadeo KM, Thompson P, et al. Autologous CD33-CAR-T cells for treatment of relapsed/refractory acute

- myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2021; 35(11): 3282-86. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01232-2>
36. Wang Q, Wang Y, Lv H, Han Q, Fan H, Guo B, et al. Treatment of CD33-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells in One Patient With Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*. 2014;23:184–91. Disponible en: [www.moleculartherapy.org](http://www.moleculartherapy.org)
  37. Marcus A, Eshhar Z. Allogeneic chimeric antigen receptor-modified cells for adoptive cell therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(7):947–54.
  38. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017;23(9):2255–66.
  39. Graham C, Jozwik A, Pepper A, Benjamin R. Allogeneic car-t cells: More than ease of access? *Cells*. 2018;7(10):1-11.
  40. Li C, Mei H, Hu Y. Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy. *Brief Funct Genomics*. 2020;19(3):175–82.
  41. Scholefield J, Harrison PT. Prime editing – an update on the field. *Gene Ther*. 2021;28(7–8):396–401.
  42. Qasim W. Allogeneic CAR T cell therapies for leukemia. *Am J Hematol*. 2019 ;94(S1):S50–4. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.25399>
  43. Kamiya T, Wong D, Png YT, Campana D. A novel method to generate T-cell receptor-deficient chimeric antigen receptor T cells. *Blood Adv*. 2018;2(5):517–28.
  44. Liu X, Zhao Y. CRISPR/Cas9 genome editing: Fueling the revolution in cancer immunotherapy. *Curr Res Transl Med*. 2018;66(2):39–42. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.retram.2018.04.003>
  45. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017;8(10):17002–11.
  46. Bhatkar D, Sarode SC, Sarode GS, Patil S, Sharma NK. CRISPR-Cas genome editing tool: A narrow lane of cancer therapeutics with potential blockades. *Transl Cancer Res*. 2020;9(4):3135–41.
  47. Wu HY, Cao CY. The application of CRISPR-Cas9 genome editing tool in cancer immunotherapy. *Brief Funct Genomics*. 2019;18(2):129–32.
  48. Hazafa A, Mumtaz M, Fras M, Bilal S, Nasir S, Firdous M, et al. CRISPR/Cas 9: A powerful genome editing technique for the treatment of cancer cells with present challenges and future directions. *Life Sci*. 2020; 263: 118525.
  49. Salas-Mckee J, Kong W, Gladney WL, Jadowsky JK, Plesa G, Davis MM, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the era of CAR T cell immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother*. 2019;15(5):1126–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2019.1571893>
  50. 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. *Hum Immunol*. 2018;79(12):876–82.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.09.007>

51. Hu K jia, Yin ETS, Hu Y xian, Huang H. Combination of CRISPR/Cas9 System and CAR-T Cell Therapy: A New Era for Refractory and Relapsed Hematological Malignancies. *Curr Med Sci.* 2021;41(3):420–30.
52. Yang Y, Jacoby E, Fry TJ. Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells. *Curr Opin Hematol.* 2015;22(6):509–15.
53. Gao Q, Dong X, Xu Q, Zhu L, Wang F, Hou Y, et al. Therapeutic potential of CRISPR/Cas9 gene editing in engineered T-cell therapy. *Cancer Med.* 2019;8(9):4254–64.
54. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med.* 2020;382(6):545–53.
55. Robillard N, Wuillème S, Lodé L, Magrangeas F, Minvielle S, Avet-Loiseau H. CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target. *Leukemia.* 2005;19(11):2021–2.
56. Jaskova K, Pavlovicova M, Jurkovicova D. Electrophysiological variability in the SH-SY5Y cellular line. *Gen Physiol Biophys.* 2014;31(4):375–82.
57. Xu Q, He S, Yu L. Clinical Benefits and Safety of Gemtuzumab Ozogamicin in Treating Acute Myeloid Leukemia in Various Subgroups: An Updated Systematic Review, Meta-Analysis, and Network Meta-Analysis. *Front Immunol.* 2021;12:1-14.
58. Wang QS, Wang Y, Lv HY, Han QW, Fan H, Guo B, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther.* 2015;23(1):184–91.
59. Rafiq S, Purdon TJ, Schultz LM, Brentjens RJ. CD33-Directed Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 2016; 128(22):2825. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.2825.2825>
60. Song D, Swartz MH, Biesecker SG, Borda F, Shah RR, Emtage P, et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia Expressing CD33. *Blood.* 2016; 128(22):4058. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.4058.4058>
61. O’Hear CE, Heiber J, Geiger TL. Anti-CD33 Chimeric Antigen Receptor Therapy For Acute Myeloid Leukemia. *Blood .* 2013;122(21):1441. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.1441.1441>
62. Charrot S, Hallam S, Hallam CS. CAR-T Cells : Future Perspectives. *Hemasphere.* 2019; 3(2).
63. McHayleh W, Bedi P, Sehgal R, Solh M. Chimeric antigen receptor T-cells: The future is now. *J Clin Med.* 2019;8(2):3–5.
64. Miao L, Zhang Z, Ren Z, Li Y. Reactions Related to CAR-T Cell Therapy. *Front Immunol.* 2021;12(April).
65. Ruella M, Maus M V. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J .* 2016;14:357–62.

Disponible en; <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.09.003>

66. Xu J, Wang Y, Shi J, Liu J, Li Q, Chen L. Combination therapy: A feasibility strategy for car-t cell therapy in the treatment of solid tumors (review). *Oncol Lett.* 2018;16(2):2063–70.
67. Srivastava S, Furlan SN, Jaeger-Ruckstuhl CA, Sarvothama M, Berger C, Smythe KS, et al. Immunogenic Chemotherapy Enhances Recruitment of CAR-T Cells to Lung Tumors and Improves Antitumor Efficacy when Combined with Checkpoint Blockade. *Cancer Cell.* 2021;39(2):193-208.e10. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.005>