



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia



NUEVOS TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS EN LEUCEMIA

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2024

Autor: David Ortega Parres

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Esther Caparros Cayuela

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. TRATAMIENTOS TRADICIONALES PARA LA LEUCEMIA.....	5
3.2. DESAFÍOS Y LIMITACIONES DE LOS TRATAMIENTOS ACTUALES 7	
3.3. INVESTIGACIONES RECIENTES EN NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS	9
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
a. BLINATUMOMAB JUNTO A QUIMIOTERAPIA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA INFANTIL	15
b. INHIBIDOR DE PI3K/ mTOR BEZ235 JUNTO A AGONISTA TLR-7/8 R848 EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	24
c. IBRUTINIB EN COMBINACIÓN CON ANTI CD19-CAR T EN EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC).	31
d. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS T CAR ANTI- CD19 PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA.....	34
8. CONCLUSIONES	43
9. REFERENCIAS.....	44

1. RESUMEN

La leucemia es un tipo de cáncer que afecta a la médula ósea y a la sangre, caracterizada por la producción permanente, anormal y descontrolada de leucocitos. Existen cuatro variantes principales: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y leucemia mieloide crónica.

Los tratamientos actuales incluyen quimioterapia, radioterapia, trasplante de médula ósea y terapias dirigidas. Recientemente, las terapias inmunológicas,

como los inhibidores de punto de control inmunitarios y las terapias CAR-T, han mostrado una gran esperanza. En particular, la terapia CAR-T, ha revolucionado el tratamiento de ciertos tipos de leucemia, permitiendo que las células T del propio paciente ataquen las células cancerosas. Actualmente, es común que los pacientes reciban diversas terapias para mejorar las tasas de éxito, la adherencia terapéutica y reducir los efectos secundarios del tratamiento. Las terapias combinadas más recientes son blinatumomab junto a quimioterapia, el inhibidor BEZ235 junto al agonista R848, e ibrutinib junto a Hu19-CAR T.

2. ABSTRACT

Leukemia is a type of cancer that affects the bone marrow and blood, characterized by the continuous, abnormal, and uncontrolled production of white blood cells. There are four main variants: acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and chronic myeloid leukemia.

Current treatments include chemotherapy, radiation therapy, bone marrow transplant, and targeted therapies. Recently, immunotherapies such as immune checkpoint inhibitors and CAR-T therapies have shown great promise. CAR-T therapy has revolutionized the treatment of certain types of leukemia, allowing the patient's own T cells to target cancer cells. Currently, it is common for patients to receive various therapies to improve success rates, therapeutic adherence, and reduce the side effects of treatment. The most recent combination therapies are blinatumomab along with chemotherapy, the BEZ235 inhibitor along with the R848 agonist, and ibrutinib along with Hu19-CAR T.

3. INTRODUCCIÓN

La leucemia es un tipo de cáncer del tejido sanguíneo que se caracteriza por el aumento permanente, anormal y desordenado del número de leucocitos, lo que da lugar a una invasión de la médula ósea, que impide a su vez el desarrollo normal de las células progenitoras de la sangre, y consecuentemente falta de

glóbulos rojos y plaquetas. Esta situación provoca una debilidad del sistema inmune del organismo afectado, lo que dificulta su función para combatir infecciones y queda expuesto a un gran número de enfermedades¹.

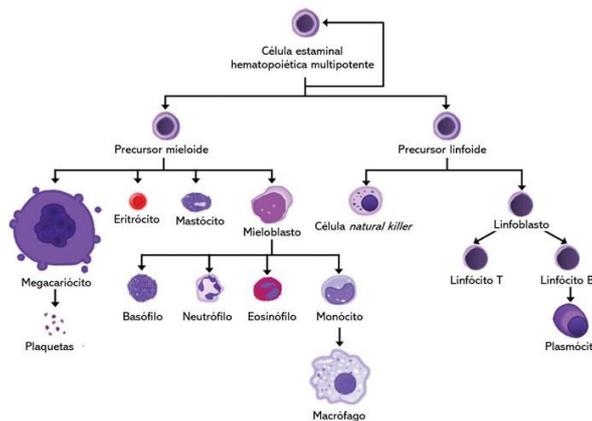


Figura 1: Hematopoyesis: proceso de formación de las células sanguíneas.

Adaptado de: ²

Se pueden distinguir diversos tipos de leucemias, según el tipo de células sanguíneas (Figura 1) que se ven afectadas y la velocidad de progresión de la enfermedad. Los principales tipos de leucemia son:

- Leucemia linfoblástica aguda (LLA): Es la neoplasia más frecuente en la infancia, constituyendo el 80% de todas las leucemias agudas de la edad pediátrica. Se caracteriza por la producción excesiva de linfoblastos inmaduros en la médula ósea. Los signos y síntomas incluyen debilidad, fiebre, moretones, petequias, dolor óseo y articular, pérdida de apetito y aumento de ganglios linfáticos inflamados³.
- Leucemia mieloblástica aguda (LMA): Se caracteriza por la producción excesiva de mieloblastos inmaduros en la médula ósea. La LMA progresa rápidamente y aparece en todas las edades, aunque es más frecuente en adultos. Los síntomas generalmente incluyen bajas defensas, sangrado excesivo, anemia, fatiga, confusión, debilidad y palidez⁴.

- Leucemia mieloide crónica (LMC): La causa está relacionada con una anomalía cromosómica, conocida como cromosoma Filadelfia (Ph). La LMC progresa lentamente en sus primeras etapas, pero puede acelerarse en etapas posteriores, siendo esta fase más peligrosa. Los síntomas más frecuentes son fiebre, dolor óseo y una inflamación del bazo⁵.
- Leucemia linfática crónica (LLC): Se caracteriza por la producción excesiva de linfocitos B anormales en la médula ósea y en la sangre periférica. Es más común en adultos y progresa lentamente. Es rara en niños. Los síntomas más comunes son ganglios linfáticos inflamados, pérdida de peso sin causa aparente, fatiga, debilidad, sudores nocturnos abundantes y moretones⁶.

3.1. TRATAMIENTOS TRADICIONALES PARA LA LEUCEMIA

Hay diferentes tipos de tratamiento disponibles para los pacientes con leucemia. Algunos tratamientos son estándar (tratamiento que se usa en la actualidad) y otros se encuentran en evaluación en ensayos clínicos. Actualmente, entre los tratamientos empleados en pacientes con leucemia en la actualidad encontramos:

3.1.1. Quimioterapia

La quimioterapia emplea fármacos para interrumpir la formación de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o al impedir su multiplicación. Cuando la quimioterapia se toma por vía oral o intravenosa, los fármacos ingresan en el torrente sanguíneo y pueden llegar a afectar tanto a las células cancerosas como a las células sanas que se dividen rápidamente (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se administra directamente en el líquido cefalorraquídeo, una cavidad del organismo como el abdomen o un órgano, este actúa de forma localizada (quimioterapia regional).

La quimioterapia intratecal se usa para tratar la LLA y la LMA diseminada en adultos. Cuando se utiliza para reducir la probabilidad de que las células

leucémicas se diseminan al encéfalo y la médula espinal se llama profilaxis del SNC.

3.1.2. Radioterapia

Este tratamiento emplea rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar células cancerosas o impedir que se multipliquen dirigida al lugar de establecimiento del tumor.

La radioterapia externa a veces se usa para el tratamiento de adultos con una LLA diseminada o que es posible que se disemine al encéfalo o la médula espinal. La irradiación corporal total a veces se usa para enviar radiación hacia todo el cuerpo durante la preparación para un trasplante de células madre. La radioterapia externa también se usa como terapia paliativa para aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida.

3.1.3. Trasplante de células madre

El trasplante de células madre es un tratamiento para reemplazar la médula ósea del paciente con células madre sanas. Las células madre se extraen de la sangre o la médula ósea del paciente (trasplante autólogo) o de un donante (trasplante alogénico), que posteriormente se congelan y almacenan. Después de que el paciente termina la quimioterapia o la radioterapia corporal total, las células madre almacenadas se descongelan y se devuelven al paciente mediante una infusión.

3.1.4. Observación cautelosa

La observación cautelosa es el control atento de la afección de un paciente sin administrar ningún tratamiento a menos que aparezcan signos o síntomas, o que estos cambien. También se llama espera vigilante y observación de los síntomas. La observación cautelosa se usa para tratar la LLC asintomática y sintomática o progresiva.

3.1.5. Infusión de linfocitos de un donante

La infusión de linfocitos de un donante (ILD) es un tratamiento del cáncer que se puede utilizar después de un trasplante de células madre. Se extraen los linfocitos (un tipo de glóbulo blanco) de la sangre de un donante y se pueden congelar para almacenarlos. Los linfocitos del donante se descongelan, si se congelaron, y se administran al paciente en una o más infusiones. Los linfocitos perciben las células cancerosas del paciente como ajenas al cuerpo y las atacan.

3.1.6. Cirugía

Se lleva a cabo potencialmente una esplenectomía con extirpación del bazo.

3.1.7. Otras terapias con medicamentos

El trióxido de arsénico y el ácido transretinoico total (ATRA) son fármacos que interrumpen la multiplicación de las células leucémicas o ayudan a estas células a madurar. Se utilizan en el tratamiento del subtipo de LMA llamado leucemia promielocítica aguda.

Estos tratamientos pueden administrarse tanto solos como en combinación, dependiendo del tipo de leucemia, la etapa de desarrollo de la enfermedad y la salud general del paciente. Es común que los pacientes reciban diversas terapias para mejorar así las tasas de éxito, la adherencia terapéutica y reducir los efectos secundarios del tratamiento⁷.

3.2. DESAFÍOS Y LIMITACIONES DE LOS TRATAMIENTOS ACTUALES

A pesar de la gran utilidad que presentan los tratamientos tradicionales en algunos pacientes en la actualidad, se presentan algunos desafíos y limitaciones asociados con los tratamientos actuales para la leucemia. Es por ello por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos en leucemia es crucial y necesario por varias razones:

- a) Reducción de toxicidad: La mayoría de los tratamientos convencionales provocan efectos indeseados o colaterales significativos. El desarrollo de

- terapias más específicas puede ayudar a reducir estos efectos secundarios y mejorar la tolerabilidad del fármaco.
- b) Mejorar la esperanza de vida: La aparición de nuevos tratamientos con mayor efectividad y menor toxicidad, puede aumentar las tasas de supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes.
 - c) Personalización del tratamiento: Los nuevos tratamientos, como las terapias CAR-T y las terapias dirigidas, están demostrando un gran potencial puesto que atacan directamente al mecanismo de replicación de las células tumorales, impidiendo su diseminación por el organismo. Estos tratamientos se basan en enfoques más personalizados, teniendo en cuenta las características genéticas y moleculares del paciente y de su enfermedad, lo que conduce a un tratamiento más preciso y efectivo.
 - d) Prevenir o revertir la resistencia: Algunos pacientes pueden desarrollar resistencia a los tratamientos actuales. El desarrollo de nuevas terapias permite superar estas resistencias y brindar opciones a aquellos que no responden a las terapias estándar.
 - e) Recurrencia: A pesar de una respuesta inicial positiva al tratamiento, la leucemia puede volver a ocurrir en algunos pacientes. La recurrencia de la enfermedad puede ser más difícil de tratar y puede requerir opciones de tratamiento adicionales o más intensivas.
 - f) Necesidad de trasplante de médula ósea: En algunos casos de leucemia, especialmente en leucemias agudas o en pacientes que han experimentado recurrencia, puede ser necesaria la realización de un trasplante de médula ósea. Sin embargo, este procedimiento conlleva riesgos significativos, como rechazo del injerto, infecciones y complicaciones asociadas con la supresión del sistema inmunológico.

- g) Progreso científico: La investigación y el desarrollo de nuevas terapias en leucemia contribuye al avance del conocimiento científico en oncología y hematología, con el objetivo de mejorar la cura y tratamiento de la leucemia y enfermedades relacionadas.
- h) Impacto psicológico y emocional: El tratamiento de la leucemia puede tener un impacto significativo en la salud mental y emocional de los pacientes, así como en sus familias y cuidadores. La carga emocional asociada con el diagnóstico y el tratamiento de la leucemia puede ser abrumadora y requerir apoyo psicológico y social adicional.

En resumen, aunque los tratamientos actuales para la leucemia han mejorado significativamente las tasas de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, aún existen desafíos y limitaciones que deben abordarse para mejorar los resultados del tratamiento y la experiencia del paciente. Esto incluye el desarrollo de nuevas terapias más efectivas y menos tóxicas, así como un enfoque integral que aborde las necesidades físicas, emocionales y psicológicas de los pacientes con leucemia.

3.3. INVESTIGACIONES RECIENTES EN NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS

3.3.1. Terapia dirigida

La terapia dirigida es un tipo de tratamiento para el que se utilizan fármacos u otras sustancias a fin de identificar y atacar células cancerosas específicas. A menudo, las terapias dirigidas causan menos daño a las células normales que la quimioterapia o la radioterapia.

Los anticuerpos monoclonales son proteínas del sistema inmunitario que se producen en el laboratorio para el tratamiento de muchas enfermedades, incluso el cáncer. Como tratamiento del cáncer, estos anticuerpos se adhieren a dianas específicas en las células cancerosas o en otras células que ayudan a que se formen células cancerosas. Los anticuerpos destruyen las células

cancerosas, bloquean su multiplicación o impiden que se diseminen. Los anticuerpos monoclonales se administran por infusión. Se emplean solos o para llevar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas. A continuación, se explicarán brevemente algunos de los fármacos empleados en los distintos tipos de leucemia:

a) LLA:

-Fármacos como el blinatumomab y el inotuzumab ozogamicina son anticuerpos monoclonales que se utilizan con el trasplante de células madre para tratar la LLA en los adultos.

-Por otro lado, la terapia con inhibidor de tirosina–quinasas. Este tratamiento bloquea la enzima tirosina–cinasa que hace que las células madre se conviertan en más glóbulos blancos (blastocitos) que los que el cuerpo necesita. El mesilato de imatinib, el dasatinib y el nilotinib son inhibidores de tirosina–quinasas que se usan para tratar la LLA en adultos⁸.

b) En segundo lugar, respecto a la LMA destacan:

- El gemtuzumab ozogamicina es un tipo de conjugado anticuerpo-fármaco que se usa para el tratamiento de pacientes con LMA recién diagnosticada o en recaída. Contiene un anticuerpo monoclonal que se une a CD33, que se encuentra en algunas células de leucemia, y también contiene una sustancia tóxica, que quizás ayude a destruir células cancerosas⁹.

Las siguientes son otras terapias dirigidas:

- La midostaurina, un inhibidor de proteínas cinasas que se usa con ciertos tipos de quimioterapia para el tratamiento de pacientes con LMA recién diagnosticada que tienen una mutación en el gen FLT3.
- El gilteritinib, un inhibidor de tirosina–quinasas que puede mejorar la supervivencia libre de recaídas en pacientes con LMA que tienen mutaciones FLT3 ITD y son positivos para MRD (detección de enfermedad residual mensurable) alrededor del momento del trasplante⁹.

Otras terapias menos intensivas en pacientes de edad avanzada o debilitados que no pueden recibir otros tratamientos son las siguientes:

- El glasdegib (Daurismo) con quimioterapia de dosis baja. Actúa inhibiendo una proteína de la vía de Hedgehog. Esta vía es crucial en el desarrollo del embrión y el feto, y es importante en algunas células adultas, aunque puede ser muy activa en las células de la leucemia. Se administra de forma oral, una vez al día.
- c) En tercer lugar, para tratar la LLC se usan diferentes tipos de terapia dirigida:
- Terapia con inhibidor de tirosina–cinasas (ITC): El ibrutinib, el acalabrutinib, el zanubrutinib y el duvelisib son ITC que se usan para tratar la LLC sintomática o progresiva, recidivante o resistente al tratamiento.
 - Terapia con inhibidor de BCL2: tratamiento que bloquea una proteína llamada BCL2, que se encuentra en algunas células leucémicas. Es posible que esto destruya las células leucémicas o que se vuelvan más sensibles a otros medicamentos anticancerosos. El venetoclax es un tipo de medicamento inhibidor de BCL2 que se usa para tratar la LLC sintomática o progresiva, recidivante o resistente al tratamiento.
 - Terapia con anticuerpos monoclonales: Se emplean solos o para llevar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas. El rituximab, el ofatumumab, el obinutuzumab y el alemtuzumab solos y en combinación con quimioterapia, se usan para tratar la LLC sintomática o progresiva, recidivante o resistente al tratamiento⁶.
- d) Por último, en LMC se emplean los siguientes fármacos:

Inhibidores de tirosina–cinasas: Se emplean el mesilato de imatinib, el dasatinib, el nilotinib, el ponatinib, el bosutinib y el asciminib¹⁰.

3.3.2. Inmunoterapia con células T con receptor quimérico de antígenos (CAR-T)

La terapia CAR-T se basa en el empleo de linfocitos T autólogos modificados genéticamente para que expresen un receptor de antígeno quimérico (CAR) en su superficie. Al reintroducir mencionados linfocitos T modificados al paciente, el receptor quimérico es capaz de detectar antígenos de la célula tumoral y provocar su destrucción.

Esta terapia está mostrando resultados prometedores en el tratamiento de leucemia, particularmente en LLC. Los investigadores están mejorando estas terapias para que sean más efectivas y seguras, incluida la optimización de la selección de antígenos diana y el manejo de los efectos secundarios asociados.^{11,12}

3.3.3. Inhibidores de punto de control inmunitario (ICIs).

Los ICIs son un tipo de inmunoterapia pasiva, que facilita y mejora la respuesta inmunitaria existente del cuerpo. Actualmente disponemos de dos tipos de fármacos con diferente mecanismo y lugar de acción: los anti CTLA-4 y los anti-PD/PD-L 1¹³.

CTLA-4 es una molécula especializada expresada en las células T durante las primeras etapas de su activación en los órganos linfoides, lo que se conoce como etapa de cebado o *priming*. CTLA-4 interacciona con la molécula B7 expresada en la célula presentadora de antígeno con el fin de evitar una respuesta inmunitaria excesiva (autoinmunidad no deseada). De manera que los inhibidores de CTLA-4 (ipilimumab) al bloquear la interacción CTLA-4/B7, desactivan la señal de inhibición aumentando la respuesta inmunitaria de las células T contra el tumor¹³.

Por otro lado, las proteínas de puntos de control, como PD-L1 (en las células tumorales) y PD-1 (en las células T), ayudan a mantener el control de las reacciones inmunitarias. La unión de PD-L1 a PD-1 impide que la célula T destruya las células tumorales del cuerpo (panel izquierdo figura 2). El bloqueo de la unión de PD-L1 con PD-1 mediante un inhibidor de puntos de control

inmunitario (anti-PD-L1 o anti-PD-1) permite que las células T destruyan las células tumorales (panel derecho). Los inhibidores de PD-1 (nivolumab y pembrolizumab) o inhibidores de PD-L1 (atezolizumab, avelumab y durvalumab) actúan uniéndose a las proteínas de punto de control PD-1 y PD-L1, siendo capaces de estimular la respuesta inmune frente a las células tumorales.

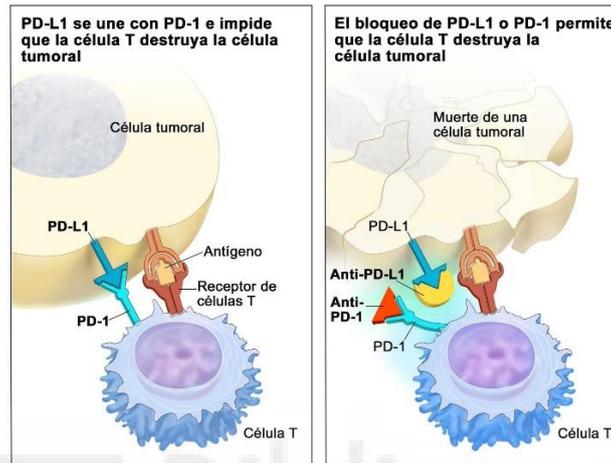


Figura 2: Inhibidores de puntos de control inmunitario PD-1 y PD-L1. ¹³

3.3.4. Inhibidores de señalización celular.

La determinación de biomarcadores asociados con el pronóstico y tratamiento de leucemia en la última década ha sido amplia como es el caso de la aplicación de inhibidores de cinasas del gen BCR/ABL empleado como blanco molecular en pacientes que expresan el cromosoma Philadelphia (Ph+LLA). Así mismo se ha descrito el promotor de señalización de supervivencia y proliferación celular ErbB y la isoforma ErbB2 que se expresa en linfoblastos de células B y su estado fosforilado está sobre expresado en pacientes Ph+LLA; que en presencia de los inhibidores canertinib y lapatinib promueve la señalización apoptótica¹⁴.

Por otro lado, está descrita el glicógeno sintetasa cinasa (GSK-3), de la familia de las serina/tirosina cinasas, identificada inicialmente en músculo esquelético, donde participa en la culminación de la síntesis de glucógeno. La sobreexpresión de GSK-3 se ha demostrado en desórdenes metabólicos y

alteraciones de los procesos de diferenciación y proliferación de células madre hematopoyéticas.

El desarrollo de LLA al igual que otras neoplasias malignas hematológicas también ha demostrado su asociación con la expresión aberrante de moléculas activadoras de la vía de JAK-STAT, incluyendo mutaciones de JAK1 y JAK2. Se han obtenido resultados favorables tras el suministro de un inhibidor de JAK¹⁴.

Las alteraciones en las vías de señalización PI3K-AKT y Ras-MAPK en neoplasias hematológicas han sido también evaluadas. Algunos de los fármacos que atacan a la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), implicada en el control del inicio de la transcripción y la inhibición de complejos PI3K y mTOR, han demostrado una gran eficacia para detener la progresión tumoral^{15,16}.

3.3.5. Técnica de edición genética y terapia génica: CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*):

Técnica de edición genética que permite modificar el genoma inhibiendo un gen defectuoso concreto o sustituyendo su secuencia por una correcta. Originalmente ha sido utilizada por las bacterias como respuesta inmune frente al ataque de virus. En los últimos años esta técnica se ha usado para modificar el genoma tanto de animales como de plantas.

CRISPR-Cas tiene muchas ventajas entre las que se encuentran: facilidad a la hora de diseñar e implantar, mayor eficacia de focalización y menor coste. Por lo tanto, se está convirtiendo en una de las herramientas más poderosas para la eliminación de un gen individual, así como su inserción y/o el control de la transcripción¹⁷.

4. HIPÓTESIS

La inmunoterapia empleada en el tratamiento para la leucemia tiene resultados eficaces. Dentro de esta, la terapia CAR-T se puede usar de forma personalizada en el tratamiento de distintos tipos de esta patología tumoral. Las terapias combinadas también pueden aumentar las tasas de remisión.

5. OBJETIVOS

1. Analizar la eficacia de la inmunoterapia en el tratamiento de la leucemia. (Terapia CAR-T).
2. Investigar los avances más recientes en terapias dirigidas para leucemia.
3. Estudiar terapias combinadas de uso en la actualidad frente a la leucemia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica extensa sobre la Leucemia y los nuevos tratamientos terapéuticos, utilizando diversas fuentes de información. Debido a que se tratan de terapias de novedad, incluso de reciente descubrimiento, se han consultado numerosos artículos de investigación científica, bases de datos (SciELO, Scopus, PubMed, Google), revistas científicas y páginas web con el fin de obtener la información más actualizada. Para elaborar la búsqueda en PubMed se ha realizado mediante el tesauro MeSH, con los siguientes términos: “Immune System”, “Leukemia” y “Treatment Outcome”. Además, para reducir los resultados de búsqueda se ha limitado el tiempo de búsqueda desde el 2022 hasta la actualidad, con un resultado definitivo de 49 artículos. Para elaborar la bibliografía se ha utilizado Mendeley, un software de referencias bibliográficas. Más adelante se muestra una enumeración completa de las fuentes consultadas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se estudiarán los avances en las terapias más novedosas con el fin de ver su efectividad en la actualidad y como potenciales tratamientos de futuro.

a. BLINATUMOMAB JUNTO A QUIMIOTERAPIA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA INFANTIL

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) con alteraciones en el gen KMT2A en lactantes es una enfermedad agresiva con un rango de supervivencia a los 3 años inferior al 40%. La mayoría de las recaídas ocurren durante el tratamiento, donde el 66% ocurren dentro del año desde el diagnóstico y dentro de los 2 años posteriores al diagnóstico el 90% de recaídas.

Aunque en niños mayores el índice de supervivencia libre de enfermedades es superior al 85% ^{18,19}, en los bebés con LLA sigue teniendo un mal pronóstico: Índice de supervivencia libre de enfermedades a los 6 años: 46% y el índice de supervivencia general: 58%. ²⁰

En concreto, los bebés con alteraciones en el gen que codifica la histona lisina N-metiltransferasa 2A (KMT2A), anteriormente conocida como leucemia de linaje mixto (LLM). Esta alteración genética la presentan el 75% de los bebés diagnosticados con LLA y provoca los peores resultados (supervivencia libre de enfermedades a los 6 años del 36% con ensayo Interfant-06).

A pesar de la intensificación de la quimioterapia y el empleo de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH), no han mejorado los resultados en las últimas 2 décadas^{20,21}. En este estudio se agregó blinatumomab al tratamiento de quimioterapia estándar en bebés con LLA con alteraciones en el gen KMT2A con el objetivo de mejorar la actividad antileucémica y la seguridad de los pacientes, comparando los datos de los resultados con un control histórico del ensayo Interfant-06. ²²

Blinatumomab es una molécula biespecífica de cadena única diseñada para unir las células B CD19+ y las células T CD3+, lo que produce la activación de los linfocitos T contra las células B CD19+. Las células leucémicas en LLA infantil son células B inmaduras que expresan el marcador CD19. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que un ciclo de blinatumomab podría agregarse al tratamiento quimioterapéutico Interfant-06 y mejorar los resultados en lactantes con LLA-KMT2A.

Respecto al estudio, se trata de un estudio de cohorte prospectivo de fase 2, de un solo grupo, internacional y multicéntrico. Respecto a los pacientes, debían

ser menores de 1 año con LLA con alteración en el gen KMT2A, CD19+ que habían sido tratados con el protocolo Interfant-06 y presentan menos del 25% de blastocitos leucémicos en la médula ósea tras la inducción. Por otro lado, se clasificaron los pacientes según nivel de riesgo²²:

- Riesgo alto: aquellos pacientes que a los 6 meses en el momento del diagnóstico con un recuento de glóbulos blancos sea de menos de 300×10^9 glóbulos blancos por litro.
- Riesgo medio: resto de pacientes con un recuento superior a 300×10^9 glóbulos blancos por litro tras el diagnóstico.

A continuación, se explicará brevemente el proceso terapéutico en el ensayo:

En primer lugar, 1 mes de terapia de inducción utilizada en Interfant-06. Posterior a la inducción, se administró dexametsasona (5 mg por metro cuadrado) por vía intravenosa durante 30 minutos. Posteriormente, un ciclo de blinatumomab de 15 microgramos por metro cuadrado al día durante 4 semanas. En el día 15 de blinatumomab se administró profilaxis intratecal con metotrexato y prednisolona. Después de la infusión con blinatumomab, se continua con el protocolo Interfant-06, con ciclos consecutivos de:

- Protocolo IB: Ciclofosfamida, citarabina y mercaptopurina.²³
- MARMA: Citarabina en altas dosis, metotrexato en altas dosis, mercaptopurina y asparginasa.
- OCTATAD: Vincristina, dexametasona, asparaginasa, daunorrubicina, tioguanina, citarabina y ciclofosfamida.
- Terapia de mantenimiento: mercaptopurina y metotrexato.

Los pacientes de alto riesgo y riesgo medio que antes de OCTATAD presentaban al menos 5×10^{-4} de enfermedad residual mínima (ERM) fueron candidatos a trasplante TCMH en la primera remisión completa.

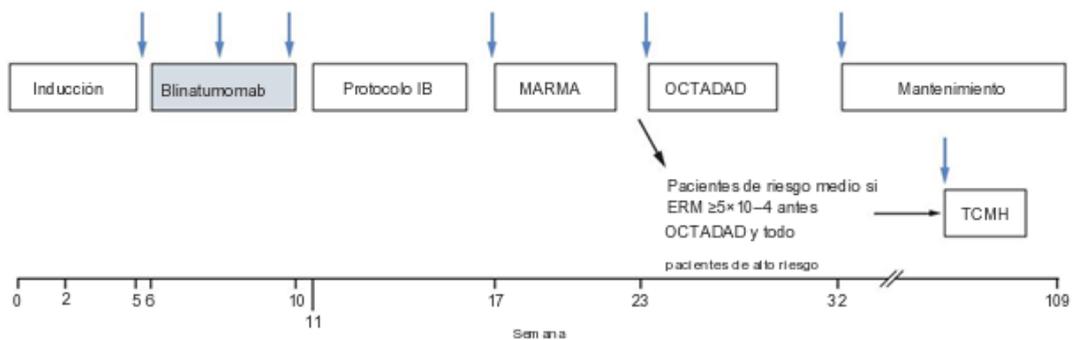


Figura 3: Protocolo de tratamiento. Las flechas de color azul señalan los momentos en los que se midió la enfermedad residual mínima (ERM)²².

La ERM se midió mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el uso de la secuencia de fusión del punto de ruptura genómico KMT2A y los reordenamientos de los genes de inmunoglobulina y del receptor de células T (TCR). Respecto al análisis estadístico también se midieron la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia general²²:

- Supervivencia libre de enfermedad (Sv LE): Tiempo transcurrido desde el ingreso al estudio hasta una posible recaída, segundo cáncer o incluso muerte.
- Supervivencia global (Sv G): Tiempo desde el ingreso al estudio hasta muerte por cualquier causa.

Se inscribieron al ensayo 30 pacientes en 12 sitios de 9 países. El seguimiento final fue el 31 de agosto de 2022. No hubo ningún retiro, pero si 5 pacientes tuvieron desvíos en el tratamiento²²:

-2 pacientes de riesgo medio, a criterio del investigador, se sometieron a TCMH (es decir, la ERM antes de OCTATAD no era $\geq 5 \times 10^{-4}$). Uno de ellos, además recibió parte del programa Interfant-06 (un ciclo de citarabina, daunorrubicina y etopósido [ADE]) en lugar del protocolo IB.

-3 pacientes revieron tratamiento alternativo después de la infusión de blinatumomab:

- 1 paciente de alto riesgo se sometió a un TCMH inmediatamente después de la infusión con blinatumomab.

- 1 paciente de alto riesgo recibió consolidación completa de estilo mieloide de Interfant-06 (ciclos de ADE y de mitoxantrona, citarabina y etopósido [MAE]) en lugar del protocolo IB antes del trasplante.
- 1 paciente de riesgo medio que no se sometió a TCMH en la primera remisión completa recibió ADE y MAE en lugar de protocolo IB, seguido de MARMA, OCTADA (OCTATAD sin daunorrubicina) y tratamiento de mantenimiento.

En general, 8 de los 9 pacientes de riesgo alto se sometieron a TCMH en la primera remisión completa, salvo 1 que murió en remisión completa justo antes del trasplante).

Ninguno de los pacientes de riesgo medio tuvo niveles altos de ERM antes de OCTATAD como para enviarlos en primera remisión completa a TCMH (en comparación con el ensayo Interfant-06 que tuvo un 20% de los pacientes con niveles de ERM altos).

No se presentaron efectos tóxicos relevantes atribuibles al blinatumomab que provocase la interrupción del tratamiento o incluso la muerte²².

Todos recibieron un ciclo completo de blinatumomab durante 4 semanas. Sin embargo, 1 de ellos, tuvo una interrupción de 2 días por una crisis hipertensiva. La dosis comenzó siendo de 5 µg por metro cuadrado al día y posteriormente se aumentó después de dos días a 15 µg por metro cuadrado al día.

Los efectos adversos desde el inicio con blinatumomab hasta el comienzo con el protocolo IB fueron los siguientes:

- 10 eventos graves en 9 pacientes:
 - Fiebre grado 1 (4 eventos).
 - Infección grado 3 o 4 (4 eventos).
 - Hipertensión grado 3 (1 evento).
 - Vómitos grado 3 (1 evento).

En total fueron 78 eventos adversos, de los cuales los más frecuentes de grado 3 o superior fueron:

- Neutropenia febril (7% pacientes).
- Anemia (17% pacientes).
- Neutropenia (7% pacientes).
- Niveles altos de γ -glutamilttransferasa (7% de pacientes).

Mientras que los efectos adversos más frecuentes de grado 1 o 2 fueron:

- Hipertensión (en el 13% de los pacientes).
- Vómitos (en el 13% de los pacientes).
- Diarrea (en el 13% de los pacientes).

Además, 12 pacientes recibieron inmunoglobulina intravenosa y 2 recibieron factor estimulante de colonias de granulocitosis.

Evento	Todos los pacientes (N=30)
Cualquier evento adverso grave: no. de pacientes (%)	9 (30)
Infección, grado 3 o 4	4 (13)
Fiebre, grado 1	3 (10)
Hipertensión, grado 3	1 (3)
Vómitos, grado 3	1 (3)
Número de eventos adversos que conducen a enfermedades permanentes continuación de blinatumomab	0
No. de eventos adversos de cualquier grado	61
No. de eventos adversos de grado CTCAE ≥ 3	---
≥ 3 Eventos adversos de grado CTCAE ≥ 3 — no. de pa- cientes (%)	
Anemia	5 (17)
Neutropenia febril	2 (7)
Faringitis	1 (3)
Hipertensión	1 (3)
Disminución del recuento de neutrófilos	2 (7)
Disminución del recuento de glóbulos blancos	1 (3)
Aumento del nivel de alanina aminotransferasa	1 (3)
Aumento del nivel de γ -glutamilttransferasa	2 (7)
hipoproteinemia	1 (3)

Figura 4: Eventos adversos ocurridos tras tratamiento²².

A continuación, se hará un repaso de los datos obtenidos en el ensayo sobre ERM. Después del ciclo de blinatumomab, el 53% (16 de 30 pacientes) tuvieron ERM negativo. Tras el tratamiento de MARMA ascendió a un 93% (26 de 28) con ERM negativo o niveles bajos de ERM ($<5 \times 10^{-4}$). Antes de OCTATAD ya el 100% de los pacientes eran ERM negativo, mientras que en el ensayo de Interfant-06 tan solo el 83% de los pacientes²².

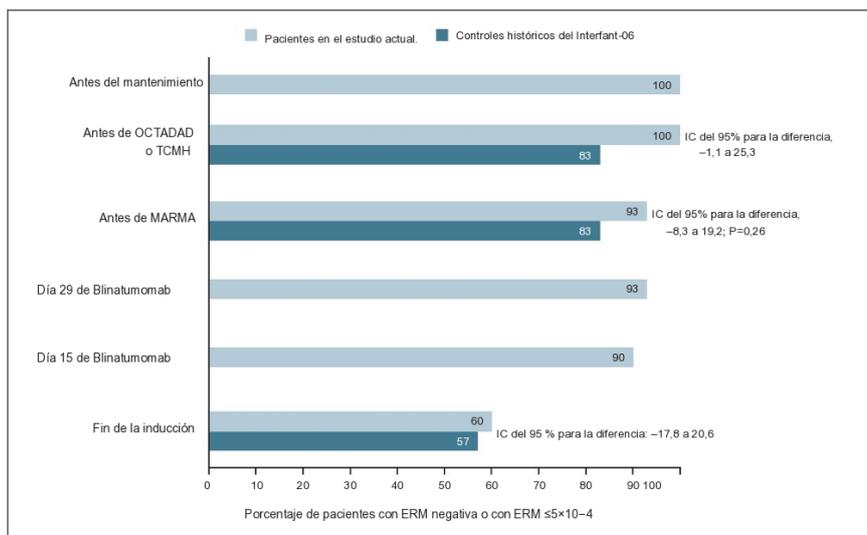


Figura 5: ERM en puntos temporales a lo largo del estudio²².

En la figura 6 se muestran las respuestas y resultados de ERM individualmente:

21 pacientes de los 30 inscritos al ensayo pertenecían al grupo de riesgo medio y los 9 restantes en riesgo alto. 2 pacientes de riesgo medio se sometieron a TCMH a criterio del investigador, mientras que los otros 19 pacientes de riesgo medio tras el tratamiento todos resultaron ERM negativo.

La negatividad de ERM después de la infusión de blinatumomab fue mayor en pacientes con riesgo medio (67%) frente a los de riesgo alto (22%). Otro dato para destacar es que fue más común la negatividad en ERM en pacientes con niveles bajos de ERM ($<5 \times 10^{-4}$) (78%) que aquellos con niveles altos de ERM (17%)²².

Respecto a los pacientes con riesgo alto, el 78% (7 de 9 pacientes) tras infusión con blinatumomab resultaron ERM negativo. El 92 % (11 de 12 de los pacientes) con altos niveles de ERM resultaron ERM negativo o bajos niveles de ERM.

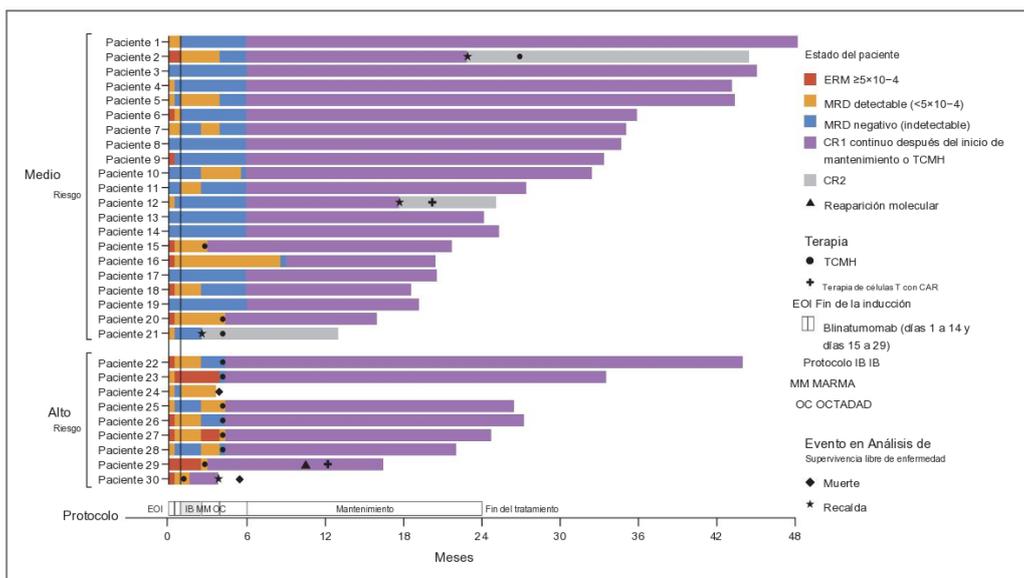


Figura 6: Respuesta y resultados de ERM en pacientes individuales²².

Tras acabar el tratamiento y después de una mediana de seguimiento de 26,3 meses, la supervivencia libre de enfermedad (Sv LE) a 2 años fue del 81,6% y la supervivencia general (Sv G) a dos años fue del 93,3%. En el ensayo de Interfant-06, a los 2 años la Sv G fue de 42,4% y la Sv LE fue del 54,5%²².

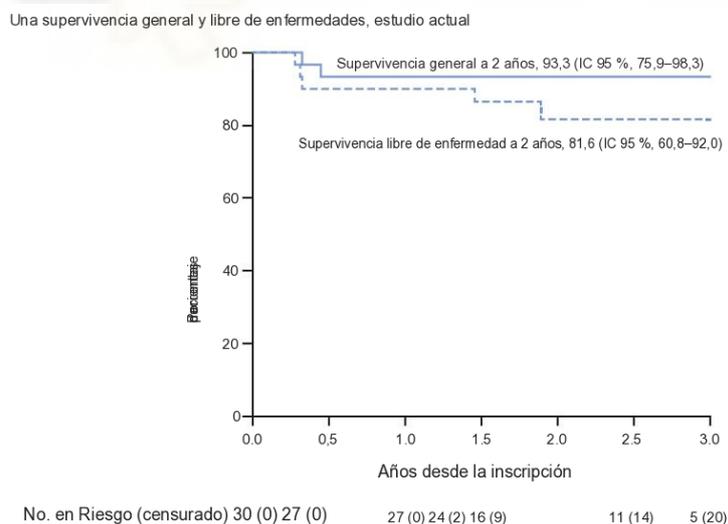


Figura 7: Sv G y Sv LE del estudio²².

A continuación, se muestra una comparación directa, considerando solo a los pacientes en el ensayo Interfant-06 que cumplieron con los criterios de inclusión utilizados en el estudio actual y para quienes había datos disponibles

sobre ERM al final de la inducción (214 pacientes). En este análisis, la Sv LE a los 2 años en el ensayo Interfant-06 fue del 49,4% y la Sv G del 65,8%.

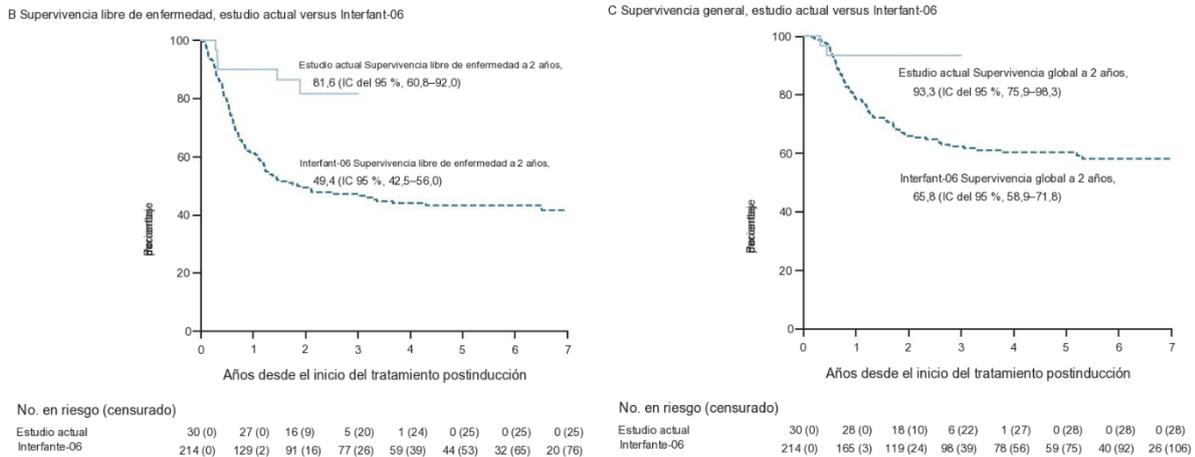


FIGURA 8 Y 9: Comparación directa entre Interfant-06 y ensayo actual de Sv LE y Sv G²².

Como ya se había comentado anteriormente, 1 de los pacientes del ensayo murió tras la primera remisión justo antes de TCMH. Se considera que no está relacionada con la infusión de blinatumomab (sangrado traqueal debido a una cánula traqueal)²².

Por otra parte, sí que se recogieron en los datos 4 recaídas:

- 2 pacientes con riesgo medio tuvieron recaída combinada de médula ósea y SNC durante el tratamiento de mantenimiento.
- 1 paciente con riesgo medio tuvo recaída del SNC durante el protocolo IB.
- 1 paciente con riesgo alto tuvo recaída combinada de médula ósea y SNC 2 meses después del TCMH. Posteriormente este paciente resultó ERM negativo tras una inmunoterapia CAR-T.

Con estos 5 pacientes que tuvieron desviaciones del protocolo de tratamiento, se realizó un análisis respecto a la Sv G y Sv LE, donde la supervivencia libre de enfermedades a 2 años fue del 83,4% y una supervivencia general del 96,2%²².

Para concluir, con la comparación de los resultados del ensayo se puede decir que la terapia combinada de blinatumomab junto a quimioterapia Interfant-06 resultó seguro y factible en bebés con LLA con alteraciones en el gen KMT2A. Los datos demuestran una mejoría en la actividad antileucémica en comparación al protocolo Interfant-06, como reflejan los resultados del ensayo disminuyendo la enfermedad residual mínima y mejorando la supervivencia a corto plazo. Aunque el tiempo de seguimiento fue relativamente corto, incluyó el periodo de mayor riesgo de recaída. Es por ello, que los resultados del ensayo son muy prometedores debido a la escasa supervivencia y falta de mejoras en los resultados entre los lactantes con LLA con alteraciones en el gen KMT2A en las últimas décadas.

b. INHIBIDOR DE PI3K/ mTOR BEZ235 JUNTO A AGONISTA TLR-7/8 R848 EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

La leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo de leucemia más prevalente y causa una carga económica significativa debido a la alta mortalidad y los altos costos de tratamiento.^{24,25}

Se han producido numerosas mejoras en el tratamiento de LMA mediante quimioterapia, radioterapia y trasplante de células madre. Sin embargo, no son del todo eficaces en muchos de los casos debido a los de resistencia y citotoxicidad contra las células normales. Por lo tanto, existe una necesidad crucial de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para los pacientes con LMA.²⁶

Actualmente, se están investigando numerosos enfoques terapéuticos para superar estos obstáculos mediante la focalización de vías de señalización y el uso de agentes inmunoestimulantes.²⁷

En este sentido, la vía de señalización PI3K/AKT/m TOR tiene un papel esencial en numerosos procesos fisiológicos y biológicos ²⁸. La inducción de la vía de señalización PI3K/AKT/m TOR se observa en 50-80% de los pacientes con LMA, lo que lo convierte en una opción de tratamiento interesante para esta neoplasia.^{29,30}

Por otro lado, los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y se consideran muy importantes en la inducción de la inmunidad antitumoral y en la regulación del sistema inmunológico.^{31,32}

En el siguiente estudio, se investigaron los efectos de la terapia combinada con el inhibidor de señalización dual PI3K/m TOR BEZ235 y el agonista TLR-7/8 R848 en un modelo de ratón con LMA.

Respecto al diseño experimental y el tratamiento de los ratones, se dividieron en los siguientes grupos experimentales: Los ratones del GRUPO I se designaron como controles normales y se alimentaron con una dieta estándar. (Sin inyectar células leucémicas WEHI-3). En segundo lugar, los ratones del GRUPO II fueron alimentados con dieta estándar como control leucémico. En tercer lugar, los ratones leucémicos del grupo III se trataron con citarabina como fármaco de quimioterapia anticancerígeno a 50 mg/kg mediante inyección intraperitoneal diariamente durante hasta 2 semanas. A los ratones leucémicos del grupo IV se les administró por vía oral 45 mg/kg de BEZ235 en N-metil-2-pirrolidona (NMP)/polietilenglicol 300 (10/90, v/v) todos los días durante hasta 2 semanas. A los ratones leucémicos del GRUPO V se les administró R848 en solución salina normal a 1,5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal cada dos días durante 14 días. Por último, el GRUPO VI fue tratado con BEZ235 y R848. (Figura 10)³³.

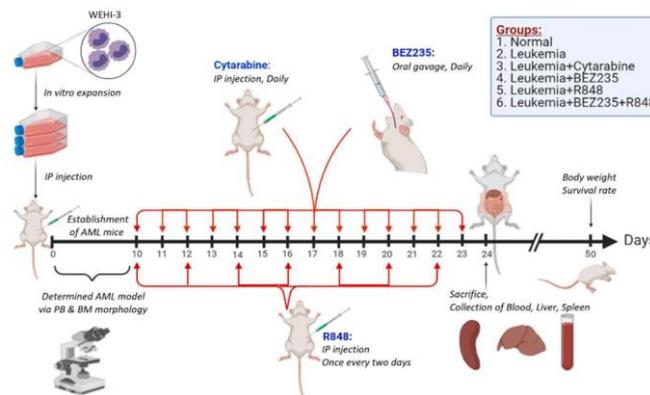


Figura 10: Diagrama esquemático del establecimiento de la leucemia en ratones BALB/c y el tratamiento con citarabina, BEZ235 y R848 ³³.

La frecuencia de células T CD4+, TCD8+, NK y células mieloides supresoras (MDSC) se midió mediante citometría de flujo.

Los datos mostraron una frecuencia superior de células T CD4+ en los ratones normales frente a los ratones leucémicos no tratados. Curiosamente, en monoterapia o terapia combinada de BEZ235 y R848 aumentó significativamente las células T CD4+ (figura 11). Sin embargo, los resultados de la frecuencia de células T CD8+ (figura 12) y NK (figura 13) no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Por otro lado, el % de MDSC de ratones leucémicos aumentó significativamente respecto a los ratones normales. Sin embargo, la terapia combinada de BEZ235 y R848 indujo una reducción notable en la frecuencia de MDSC. (figura 14)³³.

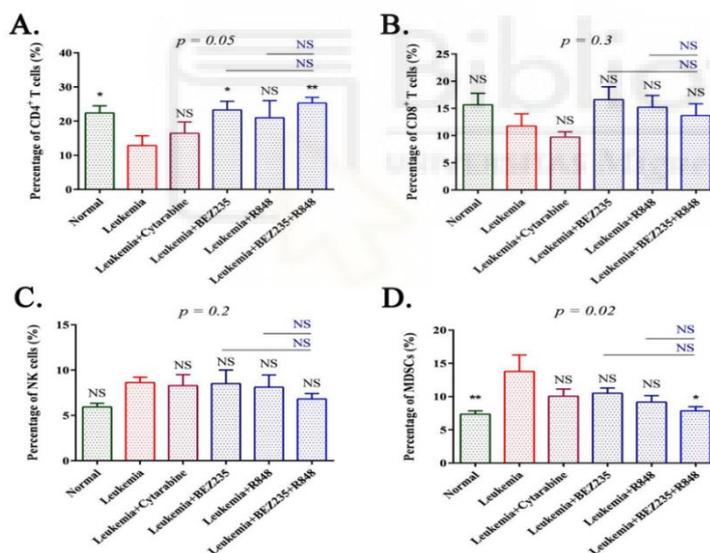


Figura 11: Comparación de las frecuencias de células T CD4+.

Figura 12: Comparación de las frecuencias de TCD8+.

Figura 13: Comparación de las frecuencias de NK.

Figura 14: Comparación de las frecuencias de células mieloides supresoras (MDSC).³³

Para investigar el equilibrio de los macrófagos M1 y M2 en el bazo de ratones B ALB/c leucémicos tratados y no tratados con BEZ235, R848 y citarabina, se determinó la expresión relativa del ARNm de iNOS (macrófagos M1) y arginasa (macrófagos M2) evaluado mediante PCR en tiempo real.

Los datos del ensayo mostraron que la expresión de iNOS disminuyó significativamente en ratones leucémicos. Sin embargo, la expresión de iNOS fue muy elevada en BEZ235 Y R848. (Figura 15).

Por otro lado, la expresión de arginasa-1 en ratones leucémicos aumentó significativamente en comparación a los ratones normales. Además, con monoterapia, y sobre todo en terapia combinada de BEZ235 y R848 hubo una mayor regulación negativa de la Arginasa-1. (Figura 16)³³.

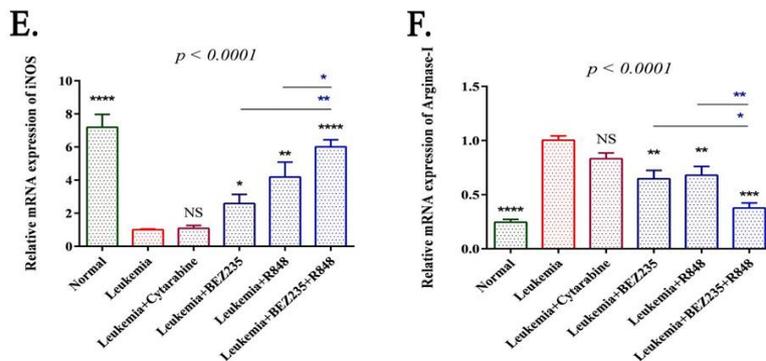


Figura 15: Expresión de iNOS en ratones leucémicos.³³

Figura 16: Expresión de Arginasa-1 en ratones leucémicos.³³

Por otro lado, se llevó a cabo un método de citometría de flujo para enumerar células T CD4+ y CD8+ agotadas en el bazo de ratones leucémicos. Los datos inmunofenotipado indicaron un aumento de % células T CD4+ agotadas en ratones no tratados en comparación con los ratones normales. Curiosamente, la frecuencia de células T CD4+ agotadas disminuyó en monoterapia BEZ235 y en terapia combinada de BEZ235 y R848 en comparación con los no tratados. (Figura 17).

Por otro lado, también aumentó el % de células T CD8+ agotadas en ratones leucémicos no tratados en comparación a los normales. Sin embargo, disminuyó considerablemente la frecuencia de estas en monoterapia R848 y terapia combinada en comparación a los ratones leucémicos no tratados. (Figura 18)³³.

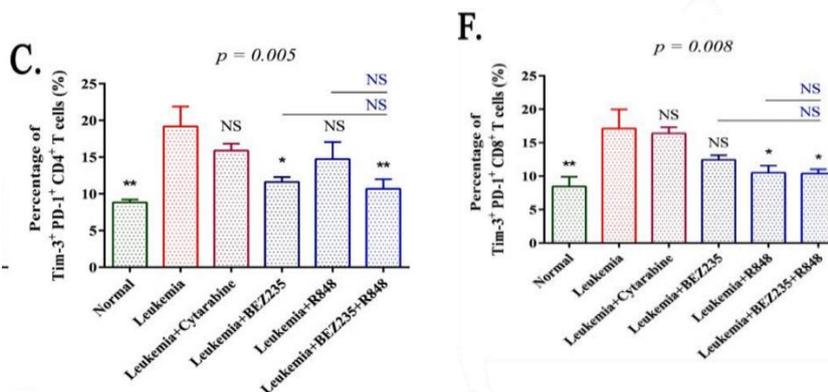


Figura 17: Frecuencia de células T CD4+ agotadas.

Figura 18: Frecuencia de células T CD8+ agotadas en ratones leucémicos³³.

Además, se investigó la expresión genética de varios ligandos de punto de control inmunológico en esplenocitos murinos mediante el método qRT-PCR utilizando el gen de referencia hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) como control interno.

Los datos mostraron que la expresión de PD-L1, Gal-9 y PVR en ratones leucémicos no tratados estaba significativamente regulada en comparación con ratones normales. Además, la expresión de estas moléculas disminuyó tras la terapia combinada BEZ235 y R848. Como se esperaba, la expresión de PD-L1, Gal-9 y PVR en ratones leucémicos tratados con citarabina no varió con respecto a los no tratados³³. (Figura 19,20 y 21).

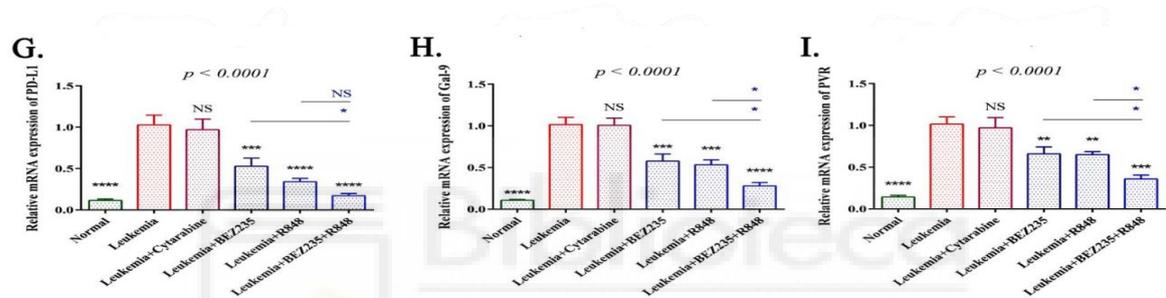


Figura 19: Expresión de PD-L1 en ratones leucémicos ³³

Figura 20: Expresión de Gal-9 en ratones leucémicos ³³

FIGURA 21: Expresión de PVR en ratones leucémicos ³³

Se evaluaron esplenocitos de ratones tratados con citarabina, BEZ235 y R848 para determinar la proliferación de células T y células B. Los datos del ensayo indicaron que la proliferación de células T fue inferior en ratones leucémicos respecto a ratones normales. Cabe destacar una mayor mejora en la proliferación de células T con la terapia combinada BEZ235 y R848. (Figura 22). Por el contrario, la capacidad de proliferación de células B no mostró grandes diferencias. (Figura 23).

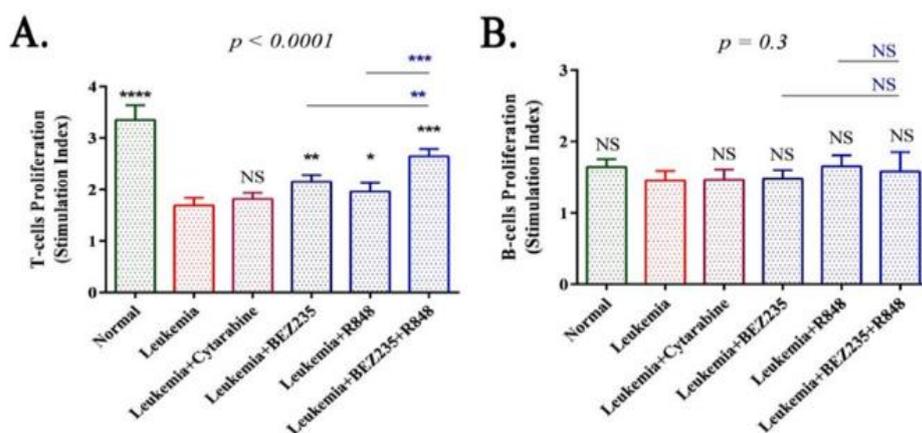


Figura 22:
Proliferación
de células T. ³³

Figura 23:
Proliferación
de células B. ³³

Además de analizar la proliferación, también se investigó si la terapia única y combinada con BEZ235 y R848 podría afectar la desgranulación de las células CTL y NK en ratones leucémicos. Los resultados mostraron que la expresión de CD107a de CTL en ratones leucémicos con terapia combinada de BEZ235 y R848 fue mayor que en ratones no tratados. (Figura 24). Por otro lado, el nivel de expresión de CD107a de NK en los ratones leucémicos no tratados fue inferior en comparación con el grupo normal. Sin embargo, con la terapia combinada de BEZ235 y R848 se elevó el nivel de expresión frente a los no tratados. (Figura 25)³³.

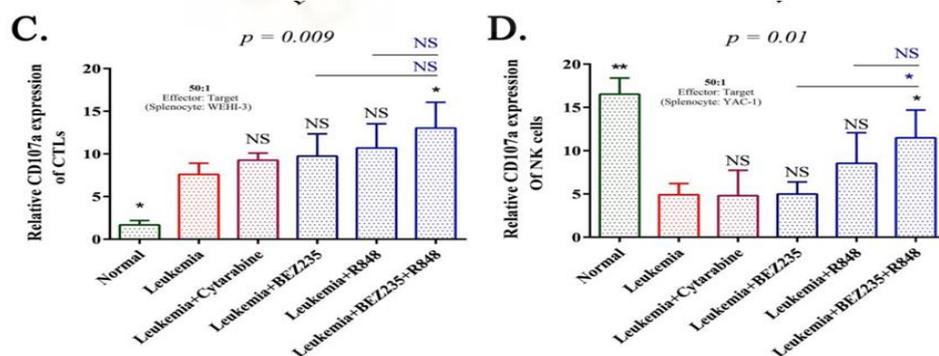


Figura 24: Expresión de CD107a de CTL en ratones leucémicos. ³³

Figura 25: Expresión de CD107a de células NK en ratones leucémicos. ³³

Finalmente, se evaluó la actividad citotóxica de las células CTL y NK en los esplenocitos de todos los ratones. Respecto a la actividad citotóxica de los CTL aumentó significativamente después de la terapia combinada de BEZ235 y R848 en comparación con los ratones no tratados. (Figura 26). Además, la

actividad citotóxica de NK también se vio aumentada tras la terapia combinada. (Figura 27).

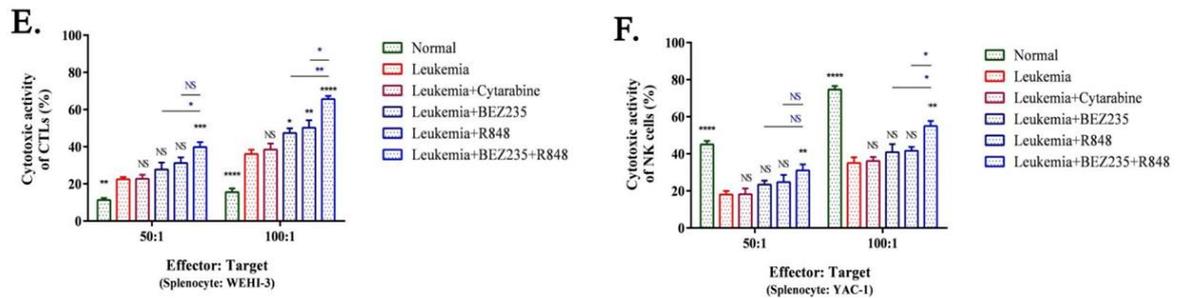


Figura 26: Actividad citotóxica de las células CTL en los ratones leucémicos.³³

Figura 27: Actividad citotóxica de las células NK en los ratones leucémicos.³³

La expresión de la transcripción genética se midió a través de las principales citocinas de la inmunidad innata (TNF α e IL-12), células Th1 (IFN γ), Células Th2 (IL-4), células Th-17 (IL-17) y células Treg (IL-10). Después de recopilar los datos del estudio, los niveles de expresión de IL-4 e IL-10 aumentaron en ratones leucémicos en comparación con el grupo sano. Sin embargo, después de la terapia única y combinada de ratones leucémicos con BEZ235 y R848, los niveles de expresión se redujeron significativamente. Además, tras la terapia combinada de ratones leucémicos con los fármacos BEZ235 y R848, aumentaron significativamente los niveles de IFN γ , TNF α , IL-12 e IL-17 en comparación con los controles³³.

También se realizó un análisis de supervivencia en ratones leucémicos tratados con BEZ235 y R848. Los ratones leucémicos tratados de forma única o combinada con BEZ235 y R848 exhibieron una tasa de supervivencia notablemente mayor en comparación con los ratones leucémicos no tratados o tratados con citarabina.

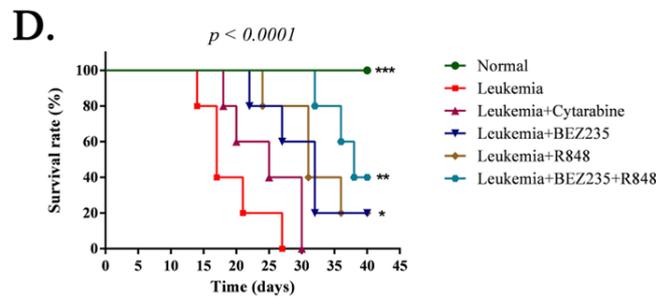


Figura 28: Tasas de supervivencia en ratones leucémicos. ³³

Para concluir, la terapia combinada con BEZ235 y R848 podría considerarse como una opción terapéutica potencial y poderosa para los pacientes con LMA. Sin embargo, a pesar de los interesantes resultados obtenidos, se requieren más estudios clínicos para ampliar los hallazgos actuales.

c. IBRUTINIB EN COMBINACIÓN CON ANTI CD19-CAR T EN EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC).

La LLC se diagnostica en alrededor de 190.000 pacientes nuevos y causa más de 60.000 muertes por año en todo el mundo, por lo que hoy en día sigue siendo un reto y uno de los grandes objetivos, investigar terapias eficaces para estos pacientes^{34,35}. En la actualidad, solo el trasplante de células madre ha obtenido resultados progresivos a pesar de la llegada de nuevas terapias. Estudios anteriores demostraron que las células CAR-T inducen remisión completa (RC) en una minoría de pacientes (entorno al 20%), pero los pacientes con LLC que logran esa remisión completa no recaen³⁶.

Los datos preclínicos del presente estudio respaldan que las interacciones se ven potenciadas entre las células T del receptor del antígeno quimérico anti-CD19 y el ibrutinib, mejorando el efecto antitumoral tras la coadministración con respecto a otros estudios^{37,38}. Por lo tanto, se inicia el estudio en pacientes con LLC avanzada o de alto riesgo que no habían logrado remisión completa (RC) con monoterapia con ibrutinib.

El siguiente estudio se trata de un estudio de fase II, con pacientes con LLC CD19+ que están recibiendo ibrutinib durante 6 meses o más y cuya mejor

respuesta al tratamiento debe no haber superado la respuesta parcial (RP). Se inscribieron 20 pacientes de los cuales 19 recibieron inducción de Hu19-CAR T. Quince tenían antecedentes de anomalías citogenéticas o moléculas de bajo riesgo detectable. Tres pacientes habían recaído tras recibir inducción de células CAR-T y 2 de ellos tenían mutaciones de resistencia a Ibritunib. Tras la inducción de Hu19-CAR T, 18 de 19 pacientes sobrevivieron y uno de ellos murió en menos de 1 mes de seguimiento¹².

Antes de la infusión de Hu19-CAR T, todos los pacientes recibieron quimioterapia linfodeplactora. Trece pacientes recibieron fludarabina y ciclofosfamida y los otros 6 recibieron bendamustina. Por otro lado, a criterio del médico tratante para la elección del régimen de acondicionamiento, catorce pacientes recibieron tres infusiones y 5 recibieron dos infusiones de Hu19-CAR T.

Después de la infusión con Hu19-CAR T, 5 de ellos en el último seguimiento, permanecieron en tratamiento con ibritunib, mientras los otros 14 pacientes lo suspendieron por diversas razones:

- 6/14 por sospecho de toxicidad de ibritunib.
- 5/14 por decisión médico-paciente por LLC indetectable.
- 1/14 por progresión de LLC con mutación BTK.
- 1/14 se sometió a quimioterapia debido a una segunda neoplasia maligna.
- 1/14 desconocido el motivo de suspensión.

Respecto a los criterios de valoración, el criterio de valoración principal fue la seguridad de la administración de Hu19-CAR T en combinación con ibritunib. Se realizó un análisis de seguridad en los 19 pacientes que recibieron el tratamiento. Los efectos adversos más destacados fueron los siguientes:

- Neutropenia en 10/19 pacientes (53%).
- Trombocitopenia en 7/19 pacientes (37%).

Solo dos pacientes requirieron tratamiento con tocilizumab. Se diagnosticó neurotoxicidad en 5 pacientes (dos de ellos con grado 1, dos con grado 2 y otro con grado 4). Un paciente murió diez días después de la infusión, tras sufrir RSC e ICANS de cuarto grado. Otro paciente murió por infección mientras tomaba ibritunib con hipogammaglobulinemia en curso en RC a los 31 meses, lo que se considera posiblemente relacionado con el tratamiento¹².

A los 3 meses, los 16 pacientes fueron evaluables para la evaluación de respuesta con el objetivo de medir la eficacia del tratamiento, de los cuales 7 habían alcanzado RC (43,8%). (Este se compara favorablemente con estudios anteriores con CAR-T 19 en pacientes con LLC progresiva sin ibritunib concurrente, donde las tasas de RC fueron del 21-29%³⁶). A los 12 meses, 14 pacientes eran evaluables y 7 estaban en RC (50%). Tres tenían ERM indetectable pero no fueron considerados en RC debido a una adenopatía residual. En lo general, a los 12 meses, la ERM fue indetectable en 13 de los 18 pacientes evaluables (72,2%) y tres de los 5 con ERM detectable a los 12 meses, habían participado previamente en un ensayo de células T CAR anti-CD19. Además, se midió la supervivencia general a los 48 meses y el resultado fue del 84% (figura 31).

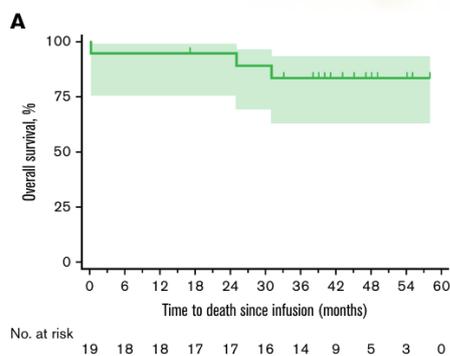


Figura 31: Supervivencia general a los 48 meses. ¹²

Posteriormente, en un seguimiento más reciente, 1 paciente había recaído y murió de enfermedad progresiva, 1 había recaído y estaba en siguiente línea de terapia, otro murió con enfermedad en remisión y el quinto había desarrollado una segunda malignidad y el estado de LLC no era evaluable. Los otros 13 estaban vivos en remisión continua, de los cuales 4 permanecen en tratamiento con ibritunib.

La enfermedad residual mínima (ERM) también se midió. De 15 pacientes con ERM indetectable a los 3 o 6 meses, 1 paciente recayó a los 12 meses y murió y otro recayó a los 41 meses y permaneció en tratamiento de siguiente línea 58 meses después de la infusión con ibritunib. De 3 pacientes que habían recibido células CAR-T, uno no respondió y los otros dos lograron remisión completa positiva para ERM. Por otro lado, de los 6 que recibieron Hu19-CAR T tras ibritunib de primera línea, los seis permanecieron en remisión en el último seguimiento¹².

La cuantificación de células Hu19-CAR T se realizó mediante citometría de flujo y reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR). La expansión máxima se produjo 10 días después de la infusión y el número máximo de células CAR-T fue de 536 células por microlitro de sangre.

A los 12 meses, 8 pacientes tenían células T CAR por encima del límite de cuantificación por qPCR (25 copias por microgramo de ADN) Y 17 pacientes tenían células CAR T por encima del límite de detección.

También se midió la duración de la aplasia de células B. El % medio de células B a los 12 meses de la infusión fue del 0,05% y las células B constituían menos del 1% de linfocitos circulantes en 13/18 pacientes¹².

Para concluir, estos resultados sugieren que la combinación de Hu19-CAR T con ibritunib da como resultado altas tasas de ERM negativa de médula ósea en pacientes con LLC. Además, se ha comprobado que la adición de células CAR-T a ibritunib mejora la seguridad y las tasas de respuesta en LLC, mejorando la función de las células T fabricadas, sensibiliza a las células CAR T a la destrucción de LLC e impulsa un superior microambiente inmunológico^{37,38}.

d. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS T CAR ANTI-CD19 PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA.

Las células T que expresan receptores de antígeno quimérico (CAR) antiCD19 tienen actividad contra la leucemia linfocítica crónica (LLC), pero las tasas de respuesta completa oscilan entre el 18% y el 29%, por lo que es necesario mejorar^{36,39}. En el siguiente estudio se ha realizado una optimización para producir células T que expresen Hu19-CAR T (Hu19-CD828Z) a partir de células monoclonales de sangre periférica (PBMC) de pacientes con Leucemia linfocítica crónica.^{40,41}

Se trata de un gran desafío la terapia CAR-T en pacientes con LLC, ya que la sangre de estos pacientes contiene un alto porcentaje de células leucémicas, por lo que se requiere métodos de purificación de células T como paso inicial⁴².

Los dos métodos más habituales utilizados en la purificación de células T en ensayos clínicos de LLC son Dynabeads TM y Sistema CliniMACS^{39,43}: Dynabeads TM (dyna) son perlas paramagnéticas con anticuerpos (Ac) contra CD3 y CD28, cuya función es tanto la purificación como la activación de células T⁴³. El sistema CliniMACS es otro método de separación magnética para purificar células T³⁹.

Además de estos sistemas de purificación, se han añadido IL-2 e IL-7+IL-15^{36,39,44} a los ensayos para realizar el cultivo celular, ya que en estudios preclínicos se ha demostrado un aumento de linfocitos T de memoria (Tscm) y una mejora en la eficacia antitumoral^{45,46}.

Este trabajo se ha codificado por un vector retroviral (MSGV1) de células madre de ratón junto a PBMC humano no modificado con anti-CD3 monoclonal, cultivado en IL-2 o IL-7+IL-15. En el día dos de cultivo no se hallaron grandes diferencias en la transducción de células CAR T (Figura 32). En el día 7 de cultivo, hubo un mayor porcentaje de CD8+ Hu19-CAR T con marcadores de superficie celular de Tscm (CD45RA+ CCR7+ CD95+)⁴⁷ para cultivos con IL-7+IL-15 que en los cultivos con IL-2. (Figura 33).

Por otro lado, los ensayos de proliferación se realizaron cultivando Hu19-CAR T marcado con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) en medio libre de citocinas con células diana CD19+ o CD19-. Cuando

se compararon las condiciones de cultivo no se observaron diferencias en la proliferación específica del antígeno según lo evaluado por dilución CFSE. (Figura 34). Sin embargo, tras 4 días de cocultivo con células diana CD19+ hubo un aumento de Hu19-CAR T mayor con IL-7+IL-15 que con IL-2. (Figura 35). Los niveles entre ambos cultivos de liberación de interferón gamma (IFN- γ) fueron muy similares. (Figura 36). Por último, en comparación con las células T Hu19-CAR cultivadas con IL-2, las células Hu19-CAR T cultivadas con IL-7+IL-15 exhibieron niveles significativamente más altos de liberación de IL-2 antígeno específico. (Figura 37). Tras evaluar los siguientes resultados, se decidió usar IL-7+IL-15 para cultivar Hu19-CAR T en estudios adicionales por encima de IL-2⁴⁸.

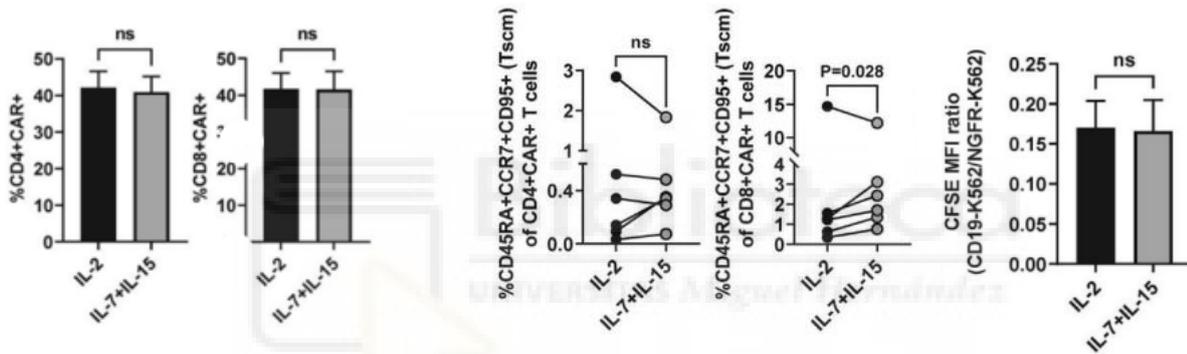


Figura 32: Comparación transducción de Hu19-CAR T cultivado en IL-2 e IL-7+IL-15.⁴⁸

Figura 33: Comparación transducción de células CD4+ y CD8+ cultivado en IL-2 e IL-7+IL-15.⁴⁸

Figura 34: Comparación en la proliferación específica de antígeno.⁴⁸

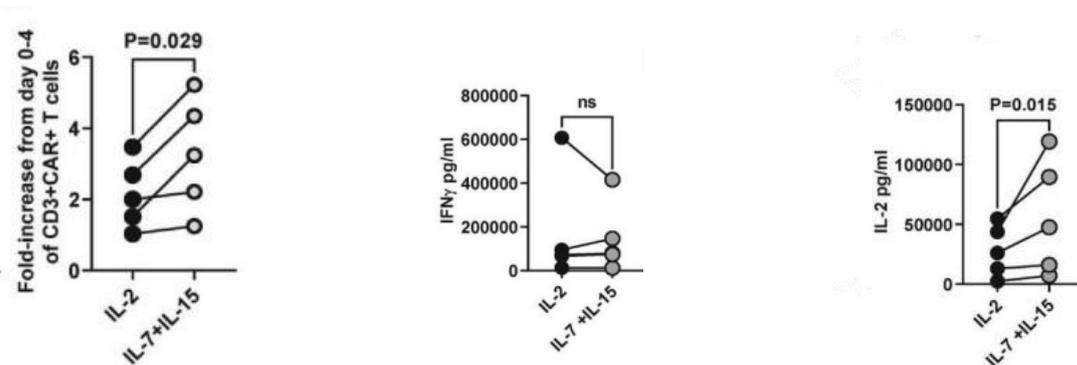


Figura 35: Comparación de CD3+ Hu19-CAR T cultivado en IL-2 e IL-7+IL-15.⁴⁸

Figura 36: Comparación de liberación de IFN-g cultivado en IL-2 e IL-7+IL-15.⁴⁸

Figura 37: Comparación de liberación de IL-2 cultivado en IL-2 e IL-7+IL-15.⁴⁸

La purificación de células T es un proceso necesario antes del cultivo y la transducción de células T, ya que la mayoría de los linfocitos sanguíneos suelen ser células leucémicas. Para ver la estrategia más eficaz se comparan dos métodos, el agotamiento de CD-19 (19-dep) y la selección CD4+ CD8+ (sel).

En ambos métodos se realiza la purificación mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS). La pureza de estas muestras, definida como el % de células CD3+, fue mayor en el método sel que en 19-dep. (Figura 38)⁴⁸.

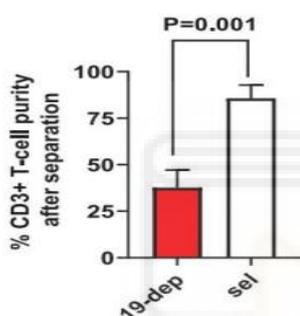


Figura 38: Comparación de purificación de células T entre método 19-dep y sel.⁴⁸

Las células ya purificadas, se activaron individualmente con tres agentes activadores diferentes:

- Dynabeads (dyna): Son perlas magnéticas que expresan anti-CD3 y anti-CD28.⁴⁹
- Transact (trans): Se trata de una nanomatriz que expresa anti-CD3 y anti-CD28.⁵⁰
- Cloudz: Microesferas solubles que expresan anti-CD3 y anti-CD28.⁵¹

Antes de comenzar la comparación entre los agentes activadores, cabe recalcar que todos los cultivos se complementaron con IL-7+IL-15. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CAR entre las células CD4 y CD8 para los diferentes métodos de preparación Hu19-CAR T (Figura 39). Del mismo modo, en el día 7 de cultivo no se encontraron grandes

diferencias en el número absoluto de células CAR T entre los diferentes métodos (Figura 40). Cabe destacar que en el día 7 de preparación, la activación de células T con el reactivo Cloudz condujo a Hu19-CAR T con una proporción más baja de CD4:CD8 (Figura 41). También hubo una tendencia hacia proporciones más bajas de CD4:CD8 con el método de 19 dep. Por otro lado, el método sel tuvo una superior pureza en células T y agotamiento de células leucémicas CD19+ que con método de enriquecimiento dyna en los días 0 y 2. Sin embargo, para el día 7 de cultivo, se igualaron los niveles de células T CD3+, incluso hubo un menor número de Hu19-CAR T en el día 7 con el método de enriquecimiento dyna versus el método sel. Es por ello por lo que no siguieron a fondo los estudios con el método dyna⁴⁸.

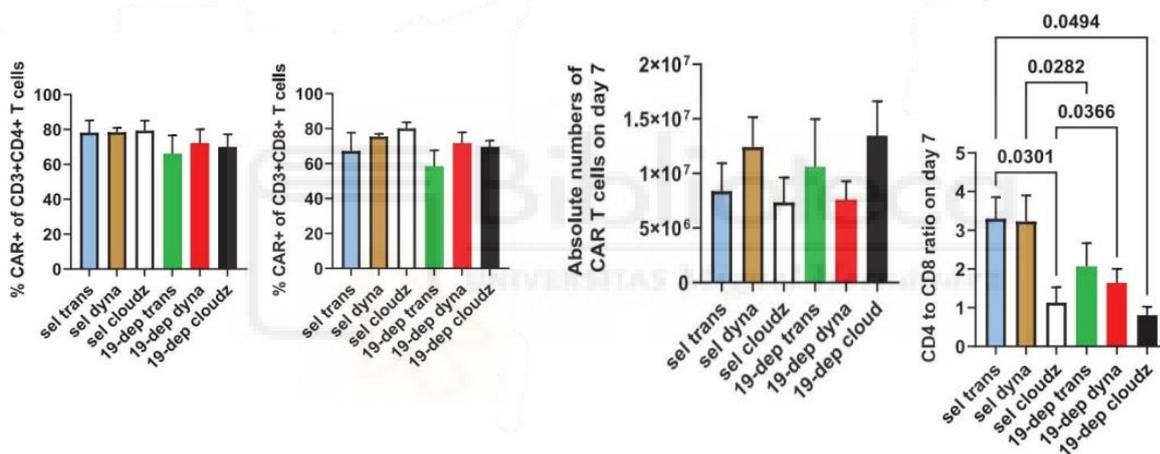


Figura 39: Comparación de expresión de CAR-T entre células CD4 y CD8 entre métodos trans, dyna y cloudz. ⁴⁸

Figura 40: Comparación de purificación de células T entre métodos trans, dyna y cloudz en el día 7. ⁴⁸

Figura 41: Comparación de purificación de células T CD4:CD8 entre métodos trans, dyna y cloudz. ⁴⁸

En general los datos demostraron datos similares de Hu19-CAR T producidos con el método 19-dep o sel independientemente de los agentes activadores, excepto con el reactivo Cloudz que generó Hu19-CAR T con una proporción más baja CD4:CD8 más baja. El método sel demostró una mayor pureza de células T y un mayor porcentaje de CCR7+ (Figura 42) y una mayor liberación de IL-2 (Figura 43), por lo que se decidió continuar con el método sel para

purificar células T de PBMC de pacientes con LCC para continuar con las pruebas.

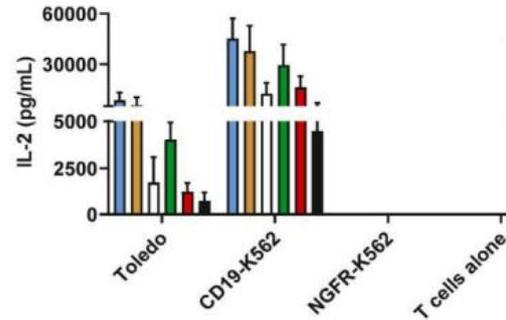
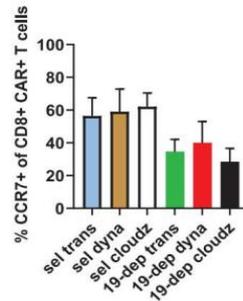
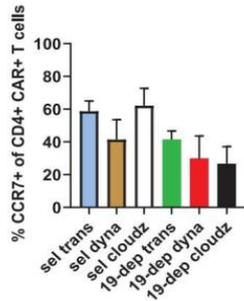
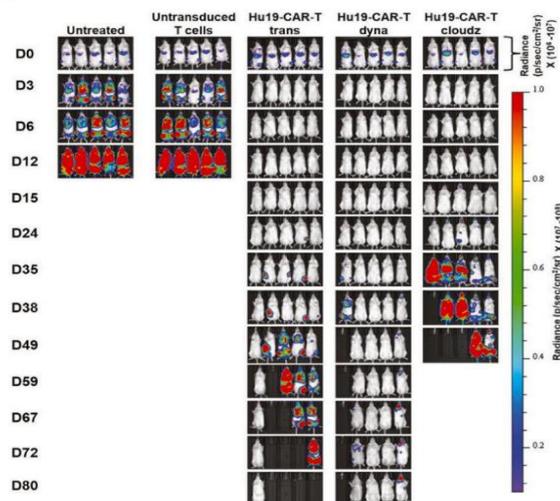
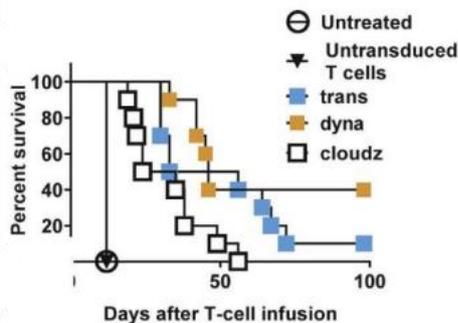


FIGURA 42: Comparación de pureza de células T y CCR7+ entre métodos trans, dyna y cloudz.

FIGURA 43: Índice de liberación de IL-2.

Por otro lado, se comparó la actividad antitumoral in vivo, donde se trataron ratones con Hu19-CAR T activados con trans, dyna o cloudz. Lo ratones tratados con Hu19-CAR T activado con cloudz exhibieron consistentemente una actividad antileucemia inferior en comparación a los otros enfoques (Figuras 44 y 45). Por otro lado, respecto a la supervivencia de los ratones, 4 de 10 ratones tratados con Hu19-CAR T activado por dyna estaban vivos al final de los experimentos, mientras que solo 1 de 10 ratones tratados con Hu19-CAR T activado por trans estaban vivos al final de los experimentos (Figura 44). Además, se asoció con una eliminación de leucemia ligeramente más sostenida⁴⁸.



Figuras 44 Y 45: Comparación actividad antileucémica con los diversos métodos de activación.⁴⁸

Además, se tomaron muestras de PBMC de tres pacientes con LLC diferentes para evaluar el método sel con los tres agentes activadores (trans, dyna y cloudz). Las tres muestras tenían 34,5%, 36,9% y 25,0% de células CD20+. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la eficiencia de transducción entre los diferentes reactivos activadores de células T para las células CD3+ CD8+, pero para las células CD3+ CD8+ se encontraron diferencias significativas. Cloudz presentó una eficiencia estadísticamente superior a la de trans. (Figura 46). También se pudo ver una desgranulación estadísticamente mayor de CD4+ Hu19-CAR T para trans frente a dyna. Para el día 7 de cultivo, con activación dyna hubo una mayor producción de células Hu19-CAR T frente a trans (Figura 47), además de una mejor eliminación del tumor in vivo. Respecto a los ensayos de proliferación, hubo una mayor eliminación de células CD4+ Hu19-CAR T antígeno específico en activación dyna que con activación cloudz (Figura 48), y hubo una tendencia hacia un mayor aumento de veces en CD8+ Hu19-CAR T con activación de dyna versus cloudz (Figura 49). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los agentes activadores para la proliferación de células T medidas mediante dilución CFSE. Tampoco hubo gran diferencia entre los diferentes métodos de activación de células T respecto a la liberación de IFN-g. (Figura 50). Sin embargo, con el método trans hubo una mayor liberación de IL-2 después del cocultivo nocturno de Hu19-CAR T con células diana CD19-K562 que con método de activación dyna (Figura 51). Por último, tanto los métodos dyna como trans fueron igualmente capaces de inducir citotoxicidad a células leucémicas. (Figura 52)⁴⁸.

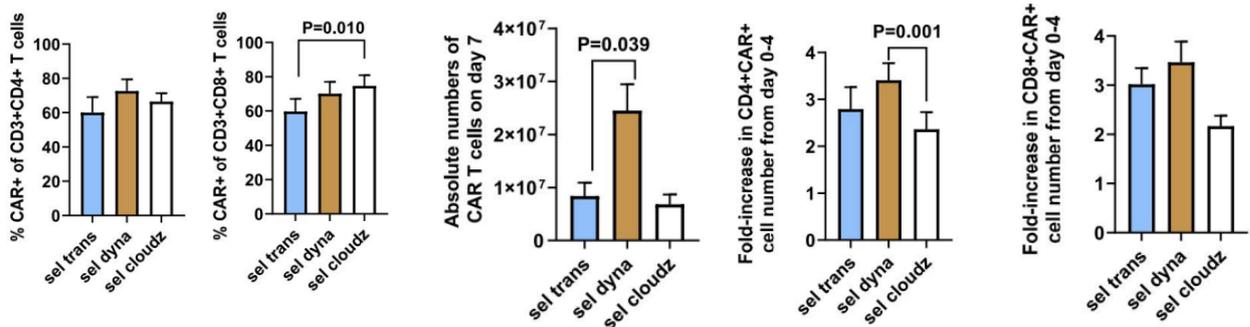


Figura 46: Evaluación de eficiencia de transducción para las células CD3+ y CD8+.⁴⁸

Figura 47: Evaluación de producción de Hu19-CAR T en el día 7.⁴⁸

Figura 48: Evaluación de eliminación de células CD4+ Hu19-CAR T.⁴⁸

Figura 49: Evaluación eliminación de células CD8+ Hu19-CAR T.⁴⁸

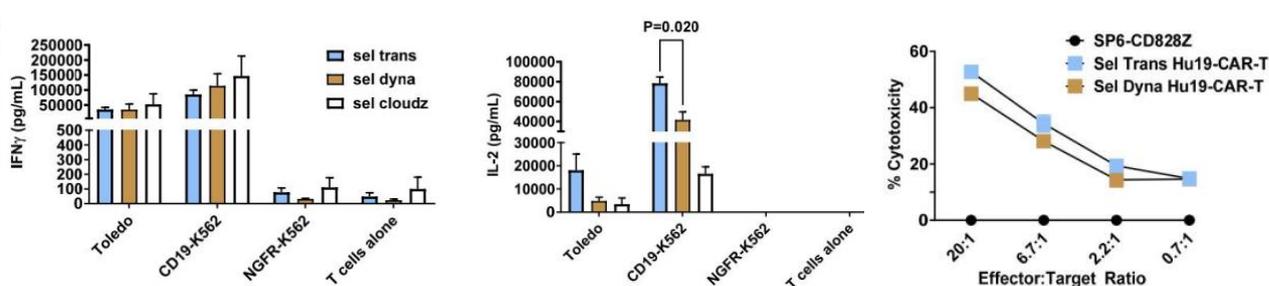


Figura 50: Evaluación de liberación de IFN-gamma.⁴⁸

Figura 51: Evaluación de liberación de IL-2.⁴⁸

Figura 52: Evaluación de índice de citotoxicidad.⁴⁸

Por otro lado, en este ensayo se administró Rtx tres veces por semana durante los 30 días posteriores a la infusión de Hu19-CAR T. Los resultados demostraron que Rtx no afectó ni mejoró la eficacia antitumoral de Hu19-CAR T, pero existen 3 razones por las que administrar Rtx junto a la terapia CAR-T podría mejorar la actividad antitumoral en comparación con Rtx solo:

1. Los pacientes con LLC expresan CD20 y Rtx presenta actividad anti-CD20.
2. Administrar Rtx antes de la aféresis podrá reducir las células leucémicas, lo que facilitará la obtención de una población de células T altamente pura tras la selección CD4+ CD8+ (Primer paso en la producción de células Hu19-CAR T)⁴⁸.
3. La administración de Rtx podría reducir la toxicidad asociada con Hu19-CAR T porque Rtx reduce la carga celular en pacientes con LLC.

Tras haber evaluado diferentes parámetros de producción celular, a continuación, se desarrollará un proceso de producción de células Hu19-CAR T

GMP compatible. En este proceso se ha necesitado reactivos de activación dyna, CD4+ CD8+ selección y cultivo mediante IL-7+IL-15. El proceso clínico de purificación de células T eliminó la mayoría de las células B CD19+ de CLL PBMC (Figura 53) y dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en la pureza de las células T (Figura 54). La Figura 55 muestra la tasa de acumulación de Hu19-CAR T durante el proceso de cultivo celular clínico. Tras el proceso de producción, se obtuvieron niveles altos de expresión CAR T (Figura 56), además de una gran liberación de IFN-g e IL-2⁴⁸.

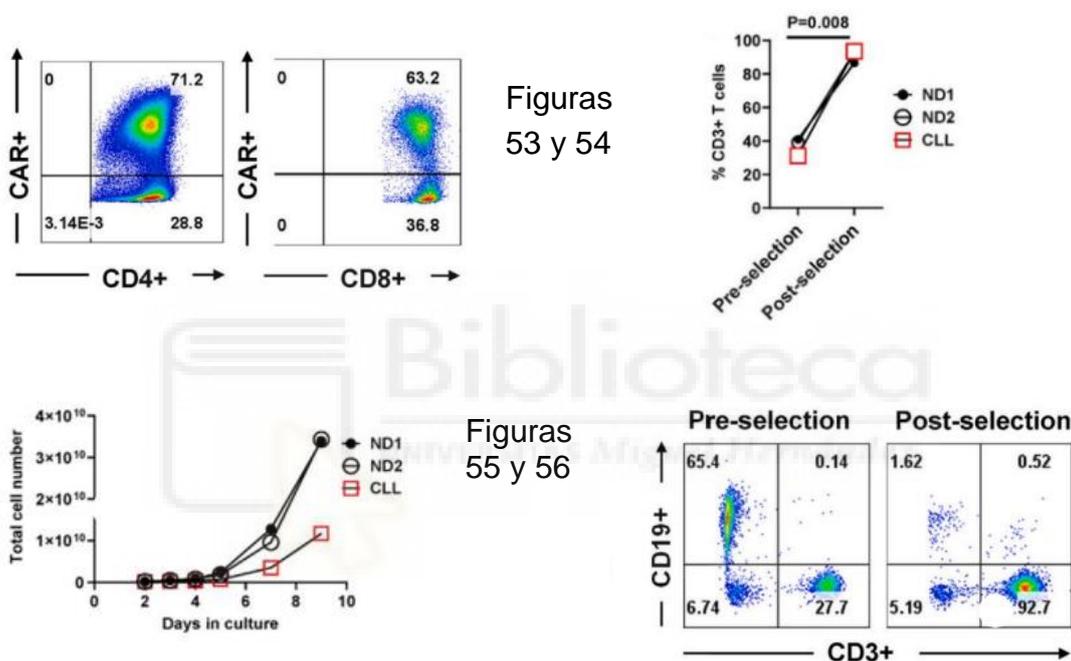


Figura 53: Eliminación de células B CD19+ tras mecanismo de purificación.⁴⁸

Figura 54: Proceso de purificación de células T tras el ensayo.⁴⁸

Figura 55: Tasa de acumulación de Hu19-CAR T durante el proceso de cultivo.⁴⁸

Figura 56: Niveles de expresión CAR-T tras proceso de producción.⁴⁸

8. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente TFG son:

- La terapia combinada de blinatumomab junto a quimioterapia Interfant-06 ha demostrado una mejoría en la actividad antileucémica, disminuyendo la ERM y mejorando la supervivencia a corto plazo. A pesar de que el tiempo de seguimiento es corto para tomar un dictamen certero, los resultados son muy prometedores debido a la escasa supervivencia y mejoras en los ensayos de lactantes con LLA en las últimas décadas.
- La terapia combinada con BEZ235 y R848 podría considerarse como una opción terapéutica potencial para los pacientes con LMA. Sin embargo, a pesar de los interesantes resultados obtenidos, se requieren más estudios clínicos para ampliar los hallazgos actuales.
- La terapia combinada de Hu19-CAR T con ibritunib muestra un gran potencial en el tratamiento de LLC. Esta estrategia podría representar un avance significativo con respecto a las terapias individuales, ofreciendo una opción terapéutica más eficaz frente a neoplasias recurrentes o resistentes.
- La CAR-T tiene actividad contra la LLC, pero las tasas de remisión completa oscilan sobre el veinte por ciento, por lo que se requiere una mejora.
- A partir de PBMCs de pacientes con LLC, los ensayos con ratones demostraron una excelente actividad antileucémica.

9. REFERENCIAS

1. Lozano JA. Offarm : farmacia y sociedad : revista de la oficina de farmacia. [Internet]. Vol. 21, Offarm. PPI; 2020 [citado 9 de mayo de 2024]. 117-122 p. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13033517>
2. Nobili L, Lionetti M, Neri A. Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. [citado 17 de mayo de 2024];7(31). Disponible en: www.impactjournals.com/oncotarget
3. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Mayo Clin Proc [Internet]. 1 de noviembre de 2016 [citado 13 de mayo de 2024];91(11):1645-66. Disponible en: <http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025619616305845/fulltext>
4. Práctica Clínica de la ESMO. ¿Qué es la leucemia aguda mieloblástica? Leucemia aguda mieloblástica ESMO/ACF Patient Guide Series [Internet]. Disponible en: www.fundacioncontraelcancer.orgwww.esmo.org
5. Antonio J, Rodríguez M. Leucemia Mieloide Crónica.
6. Serna Torroba J de la. Leucemia linfocítica crónica : guía para pacientes y familiares. AEAL; 2015.
7. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. New England Journal of Medicine. 11 de julio de 2013;369(2):111-21.
8. ¿Qué es la leucemia linfocítica aguda? Acerca de la leucemia linfocítica aguda.
9. American Cancer Society. Tratamiento de la leucemia mieloide aguda.
10. ¿Qué es la leucemia mieloide crónica? Acerca de la leucemia mieloide crónica.
11. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. 2014 [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: www.clinicaltrials.gov
12. Gill S, Vides V, Frey N V., Hexner EO, Metzger S, O'Brien M, et al. Anti-CD19 CAR T cells in combination with ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Blood Adv. 8 de noviembre de 2022;6(21):5774-85.
13. Muñoz M, Barrios Z, Sesmero M, Hospital JM, San C, Madrid C. Efectividad y seguridad de inhibidores de puntos de control inmunitario en pacientes excluidos de ensayos clínicos.
14. Layton-Tovar C. Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. Medicina e Investigación. enero de 2015;3(1):85-91.
15. Aldecoa F, Ávila J. La vía canónica PI3K/AKT/mTOR y sus alteraciones en cáncer. Horizonte Médico (Lima) [Internet]. 30 de diciembre de 2021;21(4):e1547. Disponible en: <https://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/1547>
16. Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. Semin Cancer Biol. 1 de diciembre de 2019;59:125-32.
17. García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Luis Ordoñez J, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia [Internet]. Vol. 8, Oncotarget. 2017. Disponible en: www.impactjournals.com/oncotarget/
18. Pieters R, Hoogerbrugge P, Kaspers G, Fiocco M, De Haas V, Van Der Velden V, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY ORIGINAL REPORT Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. J Clin Oncol [Internet]. 2016 [citado 10 de mayo de 2024];34:2591-601. Disponible en: www.jco.org.
19. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. J Clin Oncol [Internet]. 2015 [citado 10 de mayo de 2024];33:2938-48. Disponible en: www.jco.org
20. Pieters R, De Lorenzo P, Ancliffe P, Luis ;, Aversa A, Benoit Brethon ;, et al. Outcome of Infants Younger Than 1 Year With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With the Infant-06 Protocol: Results From an International Phase III Randomized Study. J Clin Oncol [Internet]. 2019 [citado 10 de mayo de 2024];37:2246-56. Disponible en: <https://doi.org/>

21. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet [Internet]*. 21 de julio de 2007 [citado 10 de mayo de 2024];370(9583):240-50. Disponible en: <http://www.thelancet.com/article/S014067360761126X/fulltext>
22. van der Sluis IM, de Lorenzo P, Kotecha RS, Attarbaschi A, Escherich G, Nysom K, et al. Blinatumomab Added to Chemotherapy in Infant Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 27 de abril de 2023;388(17):1572-81.
23. Stutterheim J, Van Der Sluis IM, De Lorenzo P, Alten J, Ancliffe P, Attarbaschi A, et al. Clinical Implications of Minimal Residual Disease Detection in Infants With KMT2A-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia Treated on the Interfant-06 Protocol. *J Clin Oncol [Internet]*. 2021 [citado 10 de mayo de 2024];39:652-62. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.2020.39.652>
24. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update’; *Blood Cancer J [Internet]*. 2016 [citado 9 de mayo de 2024];6:441. Disponible en: www.nature.com/bcj
25. Zhong G, Jin G, Zeng W, Yu C, Li Y, Zhou J, et al. Conjugation of TLR7 Agonist Combined with Demethylation Treatment Improves Whole-Cell Tumor Vaccine Potency in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Med Sci [Internet]*. 2020 [citado 9 de mayo de 2024];2020(15):2346-56. Disponible en: <http://www.medsci.org//creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
26. Taghiloo S, Asgarian-Omran H. Immune evasion mechanisms in acute myeloid leukemia: A focus on immune checkpoint pathways. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 de enero de 2021;157:103164.
27. Taghiloo S, Ajami A, Alizadeh-Navaei R, Zaboli E, Asgarian-Omran H. Treatment by PI3K/mTOR Inhibitor BEZ235 Combined with TLR-7/8 Agonist Interfere with Immune Evasion Mechanisms of WEHI-3 Mouse Leukemia Cells. *Iran J Immunol [Internet]*. 2017 [citado 10 de mayo de 2024];19(1):58-70. Disponible en: <https://iji.sums.ac.ir>
28. Lang F, Wunderle L, Badura S, Schleyer E, Brüggemann M, Serve H, et al. A phase I study of a dual PI3-kinase/mTOR inhibitor BEZ235 in adult patients with relapsed or refractory acute leukemia. [citado 9 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40360-020-00446-x>
29. Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia.
30. Deng L, Jiang L, Lin X hua, Tseng KF, Liu Y, Zhang X, et al. The PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 suppresses proliferation and migration and reverses multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Nature Publishing Group [Internet]*. 2017 [citado 9 de mayo de 2024]; Disponible en: www.chinaphar.com
31. Darici S, Alkhalidi H, Horne G, Jørgensen HG, Marmioli S, Huang X. Clinical Medicine Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence. [citado 9 de mayo de 2024]; Disponible en: www.mdpi.com/journal/jcm
32. Smits ELJM, Cools N, Lion E, Van Camp K, Ponsaerts P, Berneman ZN, et al. The Toll-like receptor 7/8 agonist resiquimod greatly increases the immunostimulatory capacity of human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy [Internet]*. 16 de enero de 2010 [citado 9 de mayo de 2024];59(1):35-46. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-009-0721-8>
33. Taghiloo S, Ajami A, Alizadeh-Navaei R, Asgarian-Omran H. Combination therapy of acute myeloid leukemia by dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 and TLR-7/8 agonist R848 in murine model. *Int Immunopharmacol*. 1 de diciembre de 2023;125.
34. Roberts AW, Ma S, Kipps TJ, Coutre SE, Davids MS, Eichhorst B, et al. Efficacy of venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia is influenced by disease and response variables. 2019;
35. Gribben JG. How and when I do allogeneic transplant in CLL. 2018;
36. Frey N V, Gill S, Hexner EO, Schuster S, Nasta S, Loren A, et al. Long-Term Outcomes From a Randomized Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol [Internet]*. 2020 [citado 10 de mayo de 2024];38:2862-71. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.2862>
37. Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, Fraietta JA, Qayyum S, Zhang Q, et al. The Addition of the BTK Inhibitor Ibrutinib to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells

- (CART19) Improves Responses against Mantle Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. [citado 10 de mayo de 2024];22(11). Disponible en: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
38. 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 Key Points. 2016 [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/9/1117/1395722/1117.pdf>
 39. Turtle CJ, Hay KA, Laïla-Aïcha L, Hanafi A, Li D, Cherian S, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. 2017 [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>.
 40. Brudno JN, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 15:1 [Internet]. 31 de agosto de 2017 [citado 10 de mayo de 2024];15(1):31-46. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.128>
 41. Cappell KM, Sherry RM, Yang JC, Goff SL, Vanasse DA, McIntyre L, et al. Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020 [citado 10 de mayo de 2024];38:3805-15. Disponible en: <https://doi.org/>
 42. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Hillmen P, et al. Special Report iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. 2018 [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/25/2745/1465960/blood806398.pdf>
 43. Porter DL, Hwang WT, Frey N V., 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* [Internet]. 2 de septiembre de 2015 [citado 10 de mayo de 2024];7(303). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aac5415>
 44. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RPT, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 [citado 10 de mayo de 2024];33:540-9. Disponible en: www.jco.org
 45. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Duret A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood* [Internet]. 12 de junio de 2014 [citado 10 de mayo de 2024];123(24):3750-9. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-01-552174>
 46. Zhou J, Jin L, Wang F, Zhang Y, Liu B, Zhao T. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects. [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0643-y>
 47. Muroyama Y, Wherry EJ. Memory T-Cell Heterogeneity and Terminology. 2021 [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: <http://cshperspectives.cshlp.org/>
 48. Amatya C, Weissler KA, Fellowes V, Lam N, Cutmore LC, Natrakul DA, et al. Optimization of anti-CD19 CAR T cell production for treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 14 de marzo de 2024;32(1).
 49. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*. 29 de diciembre de 2016;375(26):2561-9.
 50. Cordoba S, Onuoha S, Thomas S, Soriano Pignataro D, Hough R, Ghorashian S, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial. [citado 10 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01497-1>
 51. Cloudz Human T Cell Activation Kit CLD001: R&D Systems [Internet]. [citado 10 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.rndsystems.com/products/cloudz-human-t-cell-activation-kit_cld001#product-datasheets

