



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Nanomedicina aplicada a la terapia génica
Nanomedicine applied to gene therapy

Autora: Janire Cano Molinuevo

Directores:

Mónica López Fanarraga
Andrés Ramos Valle

Santander, Junio 2023

Índice

Resumen	5
Abstract.....	6
1 Introducción	7
2 Nanomedicina y nanotecnología.....	8
3 Terapia Génica	9
3.1 Definición, objetivo y tipos	9
3.2 Barreras biológicas y “delivery” de ácidos nucleicos.....	10
3.3 Tipos de ácidos nucleicos	12
3.4 Tipos de vectores: vectores virales y no virales.....	13
4 Vectores no virales o sintéticos.....	14
4.1 Nano-vehículos de genes basados en lípidos	14
4.1.1 Estrategia de fusión de membranas lipídicas	15
4.1.2 Ingeniería de nanopartículas lipídicas	16
4.1.3 Exosomas.....	17
4.1.4 Estearosomas	17
4.2 Polímeros y dendrímeros.....	17
4.2.1 Liberación de genes desde partículas poliméricas mediado por el pH	18
4.2.2 Liberación de genes desde part. polim. mediado por reacciones redox..	18
4.2.3 Dendrímeros.....	19
4.3 Proteínas Carrier.....	20
4.3.1 Partículas “virus-like” (VLPs).	20
4.3.2 Proteínas de unión al RNA.....	21
4.3.3 Potenciadores de la biodisponibilidad	21
4.4 Nanopartículas y nanotubos de carbono.....	22
4.5 Nanopartículas metálicas: nanopartículas de oro en gene delivery.....	23
5 Aplicación clínica de la terapia génica: el caso de las terapias CAR-T	24
5.1 Terapia de células CAR-T	24
5.2 Las terapias CAR-T aprobadas para uso clínico	26
5.3 El uso de vectores no virales en estrategias CAR-T	27
5.3.1 Nanopartículas lipídicas en terapias CAR-T	28
5.3.2 Nanopartículas poliméricas en terapias CAR-T	28
6 Conclusiones	30
7 Bibliografía	31

Resumen

En la última década, el desarrollo de la nanomedicina y la terapia génica ha logrado grandes avances en la administración de los distintos tipos de ácidos nucleicos para su aplicación en el tratamiento patologías. Los ácidos nucleicos son potenciales agentes terapéuticos y para su transporte y liberación es necesario el uso de vectores. Los sistemas de administración se basan principalmente en vectores virales, aunque estos presentan inconvenientes importantes como problemas de seguridad y baja capacidad de carga por lo que se están desarrollando vectores sintéticos como alternativa. En este trabajo de fin de grado se analizarán en profundidad los últimos avances en la producción de vectores no virales y su aplicación en diferentes enfermedades. Además, se revisará una de las aplicaciones clínicas más novedosas y prometedoras de la terapia génica: la terapia de las células CAR-T. Se analizarán los productos aprobados para su uso clínico y las nuevas tecnologías de transferencia genética no vírica para su producción.

Abstract

In the last decade, the development of nanomedicine and gene therapy has achieved great advances in the delivery of different types of nucleic acids for their application in the treatment of pathologies. Nucleic acids are potential therapeutic agents and their transport and release require the use of vectors. Delivery systems are mainly based on viral vectors, although these have significant drawbacks such as safety problems and low cargo capacity, so synthetic vectors are being developed as an alternative. In this thesis, the latest advances in the production of non-viral vectors and their application in different diseases will be analyzed in depth. In addition, one of the most novel and promising clinical applications of gene therapy will be reviewed: CAR-T cell therapy. Products approved for clinical use and new non-viral cell transformation technologies for their production will be discussed.

1 Introducción

En los últimos años, el campo de la medicina ha presenciado avances significativos en dos áreas interrelacionadas: la nanomedicina y la terapia génica. La nanomedicina se ha convertido en una disciplina prometedora que combina la nanotecnología y la medicina, ofreciendo soluciones innovadoras para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Por otro lado, la terapia génica ha surgido como una estrategia terapéutica revolucionaria que busca corregir anomalías genéticas y modificar la expresión de genes defectuosos para tratar enfermedades genéticas y adquiridas.

En la última década, tanto la nanomedicina como la terapia génica han experimentado un rápido desarrollo. La nanomedicina ha brindado nuevas herramientas y enfoques para entregar agentes terapéuticos de manera precisa y controlada, a escala nanométrica. Por su parte, la terapia génica ha progresado en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en las enfermedades genéticas y ha desarrollado técnicas para modificar y transferir genes de manera segura y eficiente.

La terapia génica ha demostrado ser de gran importancia en la medicina, ya que tiene el potencial de tratar enfermedades que actualmente carecen de opciones terapéuticas efectivas. Al abordar la causa subyacente de las enfermedades a nivel genético, se puede lograr una corrección o modulación precisa de los genes involucrados, lo que permite una intervención más precisa y personalizada. La terapia génica ha mostrado promesa en enfermedades genéticas hereditarias, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sistema inmunológico, entre otros.

En este contexto, los vehículos a escala nanométrica desempeñan un papel crucial en la terapia génica, ya que actúan como sistemas de entrega para transportar y proteger los ácidos nucleicos terapéuticos hasta el sitio de acción deseado. Estos nano vehículos, como lípidos, polímeros y nanopartículas, permiten la encapsulación y liberación controlada de los agentes terapéuticos, protegiéndolos de la degradación y mejorando su estabilidad y biodisponibilidad. Además, pueden ser funcionalizados con biomoléculas para dirigirse a células o tejidos específicos, aumentando así la eficacia y selectividad de la terapia génica.

En el presente trabajo de fin de grado, se explorarán en profundidad los conceptos generales de la nanomedicina y la terapia génica, así como los tipos de ácidos nucleicos utilizados como agentes terapéuticos. Se realizará una exhaustiva revisión de los últimos avances en vectores sintéticos, como lípidos, polímeros y nanopartículas metálicas, y se analizarán ejemplos recientes de su aplicación en diversas patologías. Por último, se dedicará una sección especial al caso concreto de la aplicación de la nanomedicina en terapias CAR-T, una estrategia terapéutica innovadora en el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: Nanomedicina, nanotecnología, terapia génica, ácidos nucleicos, vectores no virales, nanopartículas, CAR-T.

2 Nanomedicina y nanotecnología

La nanotecnología puede definirse como el diseño, caracterización, producción y aplicación de materiales, estructuras y dispositivos mediante la manipulación de su tamaño y forma en nanoescala (1 a 100 nm).¹

El concepto de nanotecnología fue introducido en 1959 por el físico y premio Nobel Richard Feynman en su artículo "There's Plenty of Room at the Bottom". En él predijo la nanotecnología y sus posibles aplicaciones, incluso describió el uso en medicina de máquinas pequeñas hasta el nivel molecular. Posteriormente, en 1974, Norio Taniguchi utilizó y definió por primera vez en la historia el término "nanotecnología" que continúa siendo válido: "la nanotecnología consiste principalmente en el proceso de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula".

Debido a que los nanomateriales son similares a las moléculas y a los sistemas biológicos en cuanto a su escala, e incluso pueden adquirir funciones, resultan útiles para su aplicación en el campo de la medicina. Por lo tanto, la nanomedicina pretende utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para diagnosticar y tratar enfermedades molecularmente. En la actualidad, los nanomateriales están siendo diseñados para el transporte selectivo de agentes diagnósticos y terapéuticos a través de barreras biológicas para que puedan acceder a dianas terapéuticas y detecten cambios e interacciones moleculares de forma sensible. Estos materiales nanométricos tienen una alta relación superficie-volumen y pueden tener propiedades magnéticas, electrónicas y biológicas ajustables. La "identidad sintética" del nanomaterial es dada por su composición química, tamaño, forma y carga superficial. La "identidad biológica" es dada por su comportamiento en entornos biológicos (biodistribución, interacción con biomoléculas, acción terapéutica) y depende directamente de sus propiedades sintéticas. Por ejemplo, la carga superficial es clave en la adsorción de proteínas séricas o el tamaño en la internalización celular.^{2,3}

El uso de la nanotecnología en la medicina comenzó a ser investigada en la década de los 90. El desarrollo del microscopio de alta resolución supuso el progreso de la biología, química y física a lo largo del siglo pasado dando lugar a nuevas disciplinas científicas como la bioquímica o la biología molecular. Con los avances en la microscopía fue posible la detección de estructuras nanométricas y la visualización de átomos individuales. Esto último fue gracias al microscopio de iones de campo (FIM), desarrollado en 1951. El uso de nuevos microscopios en el campo de la biología y química posibilitó el descubrimiento de estructuras celulares, así como de sus componentes.

En los años 60, gracias a la comprensión del DNA surgió el concepto de enfermedades genéticas y el planteamiento de futuros tratamientos personalizados.⁴ A principios de los años 80 se logró la visualización directa en el rango nano mediante la microscopía de sonda de barrido. Gerd Binnig y Heinrich Rohrer inventaron el microscopio de barrido en túnel (STM) con el que se consiguió mostrar gráficamente un átomo individual.⁵ Finalmente, en 1986 se desarrolló el primer microscopio de fuerza atómica (AFM) que permitió la manipulación de las nanopartículas de forma controlada dando paso a distintas opciones de uso y a nuevas ciencias adaptadas a la nanoescala, por ejemplo, la nanomedicina.⁶

Recientemente, se ha puesto de manifiesto el gran potencial de la nanotecnología en la biomedicina para diagnosticar y tratar enfermedades.⁷ En las últimas décadas la aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico y en la administración de fármacos ha logrado muy buenos resultados. En la actualidad se están comercializando productos para su aplicación en el campo de la medicina que contienen nanomateriales como los nanofármacos, nanopartículas con actividad antibacteriana, nanobiochips o nanobiosensores.⁸ También ha habido grandes progresos en la oncología puesto que se han desarrollado quimioterápicos más eficaces para cánceres agresivos. Esto ha sido gracias a la posibilidad de dirigir al lugar del tumor moléculas funcionales incluyendo nanopartículas y anticuerpos. Por lo tanto, la nano-oncología es una aplicación interesante de la nanotecnología ya que permite mejorar la eficacia de los tratamientos a la vez que disminuye su toxicidad sistémica.^{9,10}

3 Terapia Génica

3.1 Definición, objetivo y tipos

La FDA define la terapia génica como “una técnica que modifica los genes de una persona para tratar o curar una enfermedad y busca modificar o manipular la expresión de un gen o alterar las propiedades biológicas de células vivas para el uso terapéutico”.¹¹

En 1928, el bacteriólogo Frederick Griffith publicó un informe conocido como "Experimento de Griffith" en el que describe la transformación de una cepa de *streptococo pneumoniae* no virulenta en virulenta. Sin embargo, no fue hasta 1944 cuando Avery y McCarty demostraron que la transformación estaba causada por el ácido desoxirribonucleico evidenciando que la información genética se transporta en forma de DNA.¹² Décadas más tarde, Howard Temin, descubrió que era posible heredar mutaciones genéticas específicas como resultado de infecciones víricas y en 1968, Rogers et al. evidenciaron una primera prueba de concepto de la transferencia génica mediada por virus.^{13,14} Posteriormente, en 1990, la FDA aprobó por primera vez en humanos un ensayo de terapia génica con intención terapéutica en niños con deficiencia de adenosina deaminasa (SCID-ADA), enfermedad monogénica que provoca una inmunodeficiencia grave. Los pacientes fueron tratados con linfocitos T autólogos modificados *ex vivo* mediante la inserción del gen ADA funcional y los resultados fueron buenos, aunque difíciles de medir. En 2003, China se convirtió en el primer país en aprobar un producto basado en terapia génica para uso clínico. Se trataba de un vector adenoviral que recibió la aprobación para el tratamiento del carcinoma de células escamosas. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobó por primera vez un producto de terapia génica en 2012: Glybera. Se trataba de un vector viral diseñado para el tratamiento de la deficiencia de lipoproteína lipasa hereditaria. En 2017, la FDA aprobó la primera terapia génica basada en células CAR-T para el tratamiento de la leucemia linfoblástica y en 2018 se inició el primer ensayo clínico con CRISPR-Cas9. Desde entonces, han aumentado los ensayos clínicos de terapias génicas aprobados y se ha mejorado su eficacia y la seguridad.¹⁵

En cuanto a las dos principales estrategias de la terapia génica, podemos destacar la inhibición, también conocida como “downregulation” que consiste en inhibir la expresión de un gen o mutación y la “upregulation” que por el contrario promueve la

expresión de un gen. Ambas técnicas pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades con actividades génicas inadecuadas, como el cáncer o enfermedades de transmisión genética. También es posible la introducción de un gen exógeno que codifique una proteína terapéutica, siendo esta estrategia utilizada en la terapia génica de vacunación mediante la generación de inmunogenicidad a partir de la proteína exógena.¹⁶ Un ejemplo de ello son las vacunas contra el SARS-CoV-2 que incluyen una parte de la proteína S del virus puesto que los anticuerpos dirigidos contra ella son los que neutralizan el virus previniendo la infección.¹⁷ Generalmente, el proceso de desarrollo en la terapia génica consta de una primera fase en la que se estudia el gen patológico y las opciones para su inactivación o activación seguida de una segunda etapa que consiste en el diseño de un ácido nucleico apropiado a las condiciones requeridas por la terapia y que genere la respuesta deseada. En la última fase se crea un sistema de transporte capaz de introducir el gen en el organismo y dirigirlo hacia la diana. Este sistema consiste en el diseño de nanotransportadores capaces de administrar y liberar eficazmente ácidos nucleicos.

3.2 Barreras biológicas y “delivery” de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento tanto de enfermedades hereditarias como adquiridas, también para el uso de vacunas de DNA, terapias antivirales e inmunoterapia. No obstante, para que puedan ser transportados y liberados es necesario que superen distintas barreras biológicas y obstáculos (Figura 1). En primera instancia deben protegerse de la degradación de las nucleasas presentes en la sangre. Para ello se utilizan las siguientes estrategias: modificaciones químicas del esqueleto, por ejemplo, enlaces PS (fosofotioureato) sustituyendo a los enlaces fosfodiéster y modificaciones 2' para reducir la hidrólisis del 2'-OH; uniones covalentes de moléculas e interacciones no covalentes como la unión o encapsulación en diferentes portadores.¹⁸

Por otro lado, es imprescindible controlar el tamaño de los complejos ya que partículas demasiado grandes (mayores de 200 nm) o demasiado pequeñas (menores de 15 nm) pueden ser eliminadas tanto por los fagocitos mononucleares como por el hígado y por los riñones afectando así a su eficacia, absorción y biodistribución. Además, en la administración sistémica, las moléculas de gran tamaño son incapaces de atravesar las barreras endoteliales, a no ser que estas sean fenestradas o permeables (25). En cuanto a la biodistribución, se han obtenido mejoras significativas mediante el aumento de la interacción de los ácidos nucleicos con proteínas como la albúmina o anticuerpos ya que de esta manera se incrementa el tiempo de circulación. Por ejemplo, se ha demostrado que unión del siRNA-L2 a la albúmina mejora la farmacocinética del “small interfering RNA” (siRNA) aumentando el tiempo de circulación y reduciendo la eliminación renal rápida.¹⁹

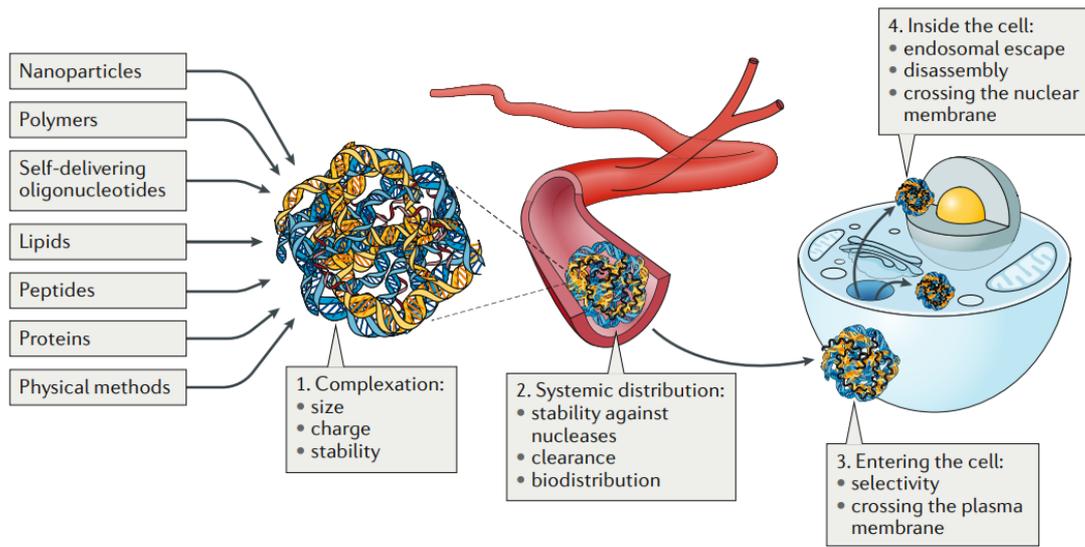


Figura 1. Materiales sintéticos y retos para la administración intracelular eficaz de genes. Adaptado de Montenegro et al. ¹⁸

La conjugación del transportador con ciertas moléculas aumenta la selectividad por células o tejidos diana mejorando la captación a la vez que disminuye los efectos no diana. Ejemplos de esta estrategia son el reconocimiento de las proteínas de membrana por anticuerpos y aptámeros. También es posible el reconocimiento de células específicas con modificaciones artificiales, por ejemplo, interacciones de *motivos coiled coil* sintéticos para el “targeting” de liposomas y la fusión de membranas entre liposomas modificados con lipopéptidos y células mediadas por coils. ^{20,21}

Para reducir la toxicidad se han desarrollado distintas estrategias para evitar el reconocimiento por el sistema inmunológico de las “virus-like particles” (VLPs) mediante un recubrimiento polimérico o el uso de nanoagujas degradables para disminuir la respuesta inflamatoria. Las nanoagujas contienen silicio poroso que son biocompatibles, geométricas y de administración favorables. Estos sistemas administrados vía subcutánea han demostrado una alta eficiencia y una toxicidad mínima para la entrega intracelular de ácidos nucleicos. ^{22,23}

Por último, una vez que los vectores han llegado a las células de interés, deben atravesar la membrana plasmática, evitar el atrapamiento endosomal e incluso en ocasiones translocarse a través de la envoltura nuclear (transfección de DNA). Diferentes estrategias han sido desarrolladas con el propósito de superar estos obstáculos, por ejemplo, modificaciones de la estructura de los ácidos nucleicos (esterificación) para facilitar el paso del vector a través de la membrana celular. Una vez internalizados, para lograr el escape endosomal se pueden utilizar métodos físicos como la disrupción mecánica y eléctrica de la membrana celular o evitar vías endocíticas. Como ejemplo representativo, el péptido CLIP6 emplea exclusivamente mecanismos no endosómicos para atravesar las membranas celulares transportando cargas directamente al citoplasma por lo que presenta una amplia utilidad para el transporte de ácidos nucleicos. ²⁴ Además, integrar ácidos nucleicos en lípidos ionizables para su administración también confiere propiedades de escape endosomal.

Con el fin de que el ácido nucleico pueda interactuar con su diana o sea reconocido por los elementos celulares requeridos para la transcripción, traducción o silenciamiento de genes, es necesario que se libere de los complejos transportadores. Para que sea viable la liberación de la carga pueden ser de ayuda mecanismos como los enlaces de disulfuro ya que los enlaces cruzados de disulfuro de la membrana dan lugar a una rápida liberación de la carga citoplasmática. El desmontaje de vehículos mediado por el pH o hialuronidasa también son útiles en el proceso de liberación de la carga.

En el caso de que sea necesario atravesar la envoltura nuclear se utilizan distintas estrategias como la disrupción de la membrana nuclear o “targeting” nuclear por medio de la electroporación y deformación o mediante la incorporación de péptidos que contienen una señal de localización nuclear. Un ejemplo de esta última estrategia consiste en el uso de péptidos que contienen secuencias asociadas a microtúbulos (MTAS) y señales de localización nuclear (NLS) que facilitan la importación nuclear rápida de su carga a través de la maquinaria de transporte de microtúbulos.²⁵

3.3 Tipos de ácidos nucleicos

Los tipos de ácidos nucleicos más empleados como agentes terapéuticos en la terapia génica son:

- **Plásmidos y minicírculos.** Son moléculas de “double-stranded DNA” (dsDNA) circular que se introducen en el núcleo celular para ser transcritas y entregar genes mediante la expresión del transgén. Una vez dentro del núcleo, estas moléculas son capaces de expresar RNA reguladores o proteínas que restauran funciones o desarrollan respuestas inmunitarias. La estabilidad estructural de estas moléculas puede verse afectada por la recombinación con el DNA celular y la oxidación por radicales libres. La adición de eliminadores de radicales libres, quelantes de iones metálicos, etanol y EDTA puede disminuir el daño, mientras que la deshidratación y la liofilización con azúcares pueden estabilizar el DNA plasmídico. Los plásmidos sin esqueleto bacteriano muestran una eficacia prolongada en comparación con el DNA plasmídico tradicional.²⁶
- **mRNA y replicones de RNA.** Son grandes moléculas de “single-stranded RNA” (ssRNA) de varias kilobases (kb) que actúan a nivel del citosol expresando la proteína de interés. Además, el replicón puede autoamplificarse y prolongar la duración de la expresión de la proteína. La estabilidad del “messenger RNA” (mRNA) es mucho menor que el DNA y depende en gran medida de su secuencia nucleotídica por lo que las modificaciones químicas del esqueleto son necesarias. La introducción de N6-metiladenosina (m6A) en el extremo 3’UTR y cerca del codon stop del mRNA, la N6,2’-O-dimetiladenosina (m6Am) y N6,2’-O-dimetiladenosina (m6Am) en la primera posición adyacente a la caperuza del extremo 5’ conllevan la generación de grupos funcionales que aumentan la estabilidad del mRNA.²⁷
- **Antisense oligonucleotide (ASO).** Son moléculas de DNA, RNA o análogos de 15 a 30 nucleótidos de longitud que se utilizan para inhibir de manera selectiva la traducción de mRNA patológico relacionado con enfermedades. La inhibición de este mRNA se logra a través de la escisión por ribonucleasa H (RNasa H) o por impedimento estérico de la traducción. La primera generación de ASO se

modificó químicamente para aumentar su resistencia a las nucleasas y biodisponibilidad, a través de un esqueleto fosforotioato que sustituye al fosfodiéster. La segunda generación incluyó modificaciones 2'-alquilo de la ribosa para mejorar la resistencia y afinidad al mRNA diana. Por último, la tercera generación incluye modificaciones químicas en nucleobases y anillos de furanosa, mejorando aún más la afinidad, resistencia a nucleasas, bioestabilidad y farmacocinética. Ejemplos de esta generación incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y el oligómero morfolino fosforoamidato (PMO).²⁸

- **Reguladores cortos RNA: siRNA y miRNA.** Son RNA cortos de 21-22 bp que facilitan la inhibición de la traducción del mRNA transcrito del gen diana dirigiendo la actividad del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). En el citosol, los siRNA dirigen el RISC a mRNA específicos para su degradación mientras que los microRNAs (miRNA) regulan la estabilidad y la traducción del mRNA. La metilación 2'-O en la ribosa 3' terminal, mediada por la RNA metiltransferasa HUA ENHANCER1 (HEN1) y sus homólogas, es una de las principales modificaciones químicas que aumenta la estabilidad de los siRNA ya que protege a los RNA pequeños de la 3' uridilación y del truncamiento que conducen a la degradación de los siRNA. Otros mecanismos que mejoran la estabilidad de los siRNA son los elementos cis en las secuencias de RNA pequeños, los RNA complementarios y las proteínas de unión a RNA.²⁹
- **DNAzimas, RNAzimas y MNAz.** Tienen 50-150 nucleótidos, normalmente con estructuras secundarias complicadas y comprenden una sola cadena de DNA (DNAzimas), RNA (RNAzimas) o múltiples cadenas (MNAzimas). Estos ácidos nucleicos contienen actividad enzimática y son utilizados como nucleasas sitio-específicas actuando tanto en el citosol como en el núcleo. En cuanto a las estrategias que mejoran la resistencia a la degradación de las nucleasas de las DNAzimas encontramos la modificación de nucleótidos en la que el azúcar ribofuranosa canónico se sustituye por un análogo de anillo de cinco o seis miembros.^{30,31}

3.4 Tipos de vectores: vectores virales y no virales

Los virus actúan como vectores naturales de la entrega de genes puesto que son capaces de unirse a las membranas celulares y ser internalizados en la célula escapando de los endosomas para llegar al citosol. Debido a que la replicación viral requiere una transferencia eficaz de su material genético a las células, los virus han sido diseñados para la transfección de genes aprobándose vectores virales modificados con fines terapéuticos.

El inicio de la terapia génica con virus se remonta a 1990 cuando los vectores virales obtuvieron éxito por primera vez. El ensayo clínico que utilizó linfocitos T transformados mediante un retrovirus recombinante portador del gen ADA para el tratamiento contra la IDCG-ADA dio lugar a la que se considera la primera terapia génica con éxito en humanos. En los últimos años, la terapia génica ha sido testigo de la aprobación de fármacos basados en vectores virales para su uso en la terapia contra el cáncer y en el tratamiento de enfermedades monogénicas entre otras. Entre los virus más utilizados se encuentran los miembros de la familia Retroviridae (gammaretrovirus y lentivirus),

adenovirus, virus adenoasociados (AAV), poxvirus y herpesvirus. Sin embargo, en la actualidad, las tres estrategias virales principales se basan en los adenovirus, los virus adenoasociados y los lentivirus.^{32,33}

En las últimas décadas, a pesar de que la aplicación de los vectores virales en la terapia génica haya logrado éxito clínico, continúan existiendo muchos retos que les impiden alcanzar todo su potencial. Los virus presentan desventajas que se relacionan con su inmunogenicidad y baja capacidad de carga que pueden ocasionar efectos secundarios fatales, así como su inactivación o el requerimiento de una terapia inmunosupresora adicional. Además, los obstáculos que supone la producción de virus a gran escala junto a su capacidad para producir mutagénesis por inserción errónea de transgenes limitan su utilidad en la terapia génica. Todos estos inconvenientes han llevado al desarrollo de sistemas de administración no virales como los vehículos sintéticos de liberación de genes. Estos vectores no víricos presentan una reducida inmunogenicidad, citotoxicidad y mutagénesis en comparación con los virales convirtiéndose así en una prometedora vía alternativa de transferencia génica.³⁴

4 Vectores no virales o sintéticos

4.1 Nano-vehículos de genes basados en lípidos

Los sistemas de administración basada en lípidos son tecnologías prometedoras para la formulación de fármacos, vacunas y productos de diagnóstico gracias a su capacidad de mejorar la biocompatibilidad, biodisponibilidad y solubilidad de los productos a la vez que disminuyen su toxicidad.³⁵ En cuanto a los mecanismos que se emplean para lograr la unión nanomaterial-ácido nucleico podemos diferenciar tres tipos principales: la fusión de membranas, la ingeniería de nanopartículas lipídicas y los exosomas o estearosomas (Figura 2).

4.1.1 Estrategia de fusión de membranas lipídicas

Las lipofección consiste en la transfección de DNA mediante el uso de lípidos catiónicos sintéticos. Estos interactúan espontáneamente con el DNA condensándolo para formar complejos lípido-DNA que se fusionan con las membranas celulares.³⁶ En la actualidad las investigaciones están enfocadas en la mejora en la fusogenicidad de los liposomas para evitar el atrapamiento endosomal y en la disminución de su toxicidad.

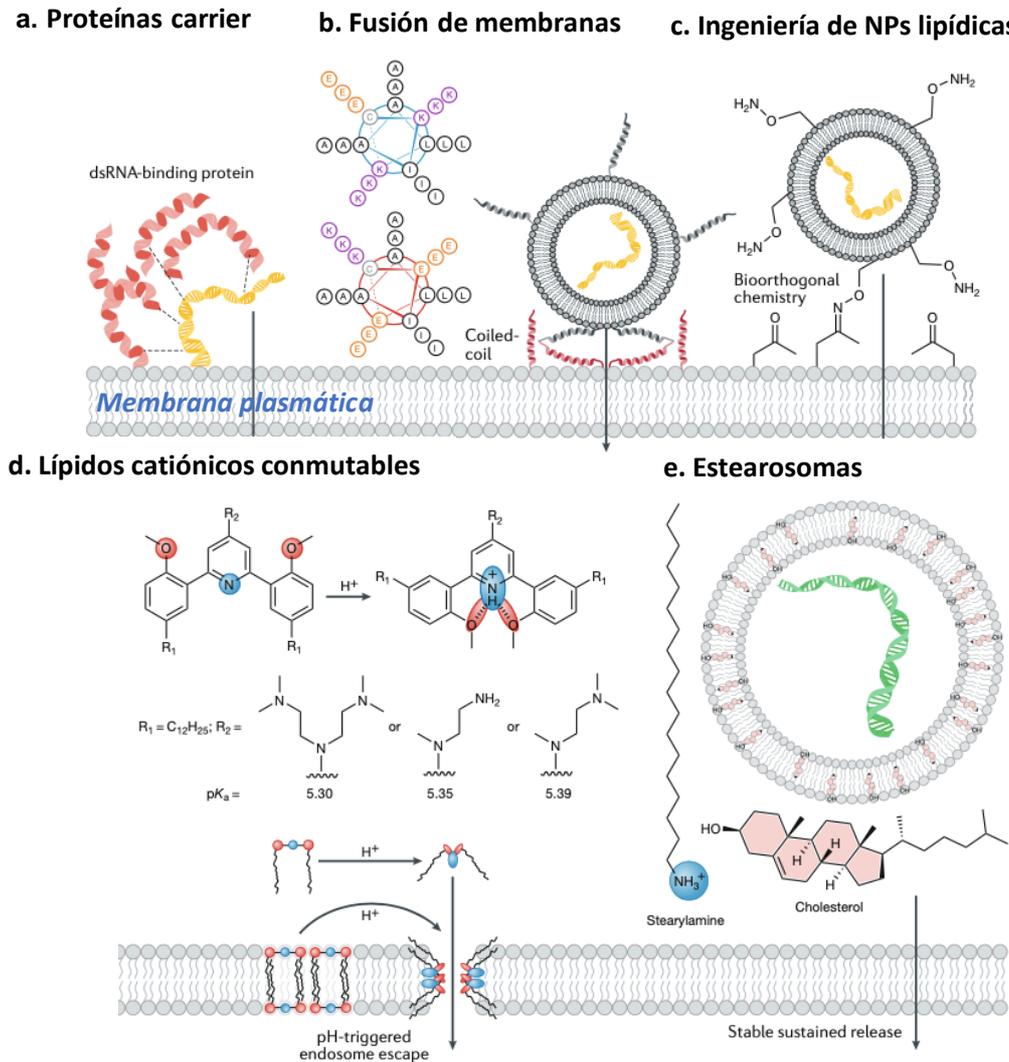


Figura 2. Sistemas de “gene delivery” basados en lípidos y proteínas: **a.** Liberación mediada por proteínas “carrier” mediante proteínas de unión a dsRNA. **b.** La fusión entre las membranas celulares y los liposomas puede potenciarse mediante diversos mecanismos como la formación de pares de coiled-coil. **c.** Se representa una reacción bioortogonal entre los lípidos que contienen alcóxiaminas del liposoma y la membrana celular cargada con lípidos que contienen grupos cetónicos. **d.** Se representa el cambio conformacional inducido por la protonación en un lípido catiónico conmutable. **e.** Los estearosomas son alternativas a los liposomas con fosfolípidos, se preparan mezclando estearilamina con colesterol. Adaptado del trabajo de Montenegro et al. ¹⁸

Las fuertes interacciones “coiled coil” forman parte de muchos procesos biológicos como la fusión de membranas y el tráfico intracelular. Para ello, se han utilizado péptidos que forman “coiled coil” para funcionalizar liposomas cargados con siRNA (Figura 2.b). Los péptidos de las vesículas modificadas se unen a la membrana celular

por medio de un anclaje al colesterol y son posteriormente internalizadas por endocitosis. Finalmente, los oligonucleótidos se liberan al citosol, dando lugar al silenciamiento o a la recuperación de la expresión génica.³⁷

Una nueva estrategia combina la fusión bio-ortogonal de liposomas, la “química clic” y la ingeniería de la superficie celular para lograr una transfección rápida y eficaz de ácido nucleicos (Figura 3).

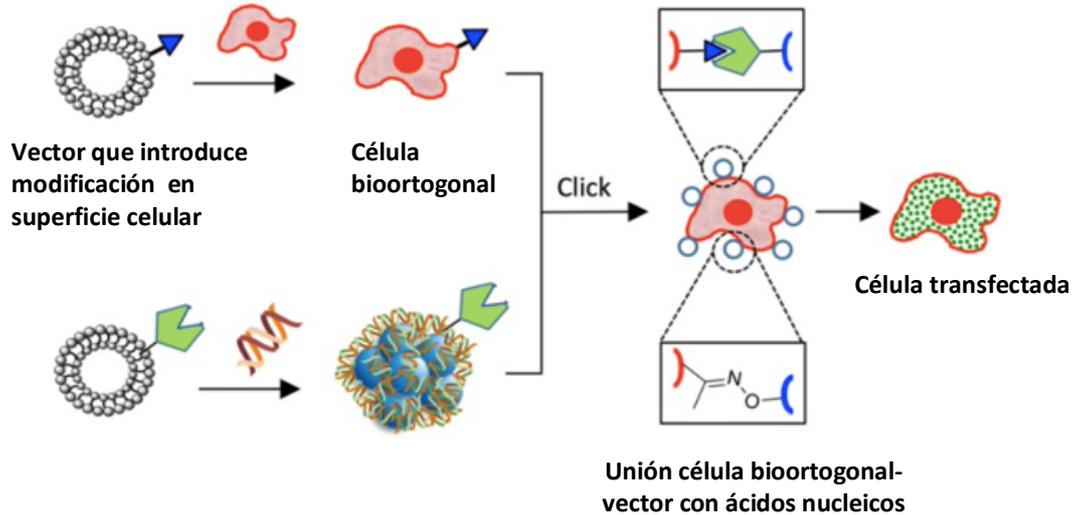


Figura 3. Esquema de la estrategia combinada de fusión de liposomas, química bio-ortogonal e ingeniería de la superficie celular para la transfección selectiva de ácidos nucleicos en células. Adaptado de O'Brien et al.³⁸

Consiste en la instalación de una molécula bio-ortogonal en la superficie de una célula mediante la fusión de liposomas de nanopartículas, mientras que el grupo funcional complementario se asocia con un ácido nucleico para que se produzca la transfección inducida por química clic.³⁸

4.1.2 Ingeniería de nanopartículas lipídicas

Las nanopartículas lipídicas pueden ser modificadas mediante mezclas de distintos lípidos en las que tanto el método de síntesis como la composición pueden mejorar su administración, biodistribución y propiedades superficiales. Las nanopartículas más eficientes están formadas por cuatro tipos de lípidos: un lípido ionizable, un lípido ayudante, PEG (polietilenglicol) y colesterol.³⁹

Entre ellos, los lípidos catiónicos conmutables (materiales lipídicos basados en cambios conformacionales dependientes del pH) son óptimos para la administración de siRNA mejorando el escape endosomal de las nanoformulaciones. Esto es debido a que cuando el interruptor conformacional es activado por el pH ácido, cambia la orientación de las cadenas de hidrocarburos promoviendo el escape endosomal y permitiendo la liberación citosólica de la carga terapéutica (Figura 2.d).⁴⁰

4.1.3 Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares sintetizadas por las células que pueden comportarse como transportadores de ácidos nucleicos y proteínas. Aunque no tengan un origen sintético, su producción y propiedades pueden ser modificadas siguiendo distintas estrategias para aplicarlos en el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades.

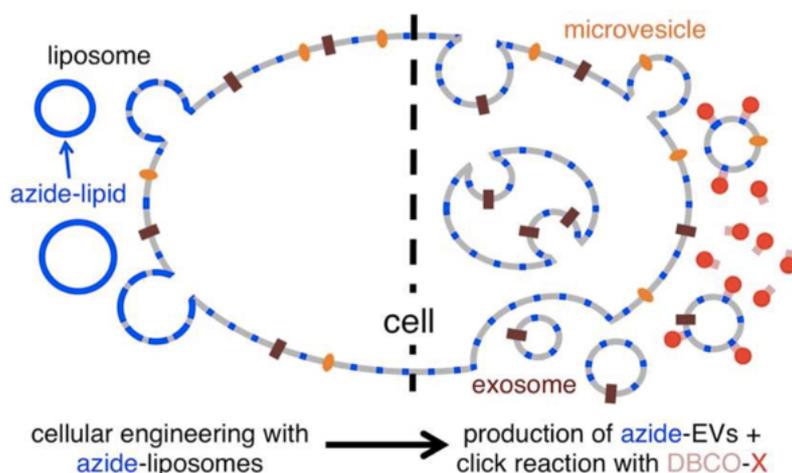


Figura 4. Estrategia para la generación de exosomas con la superficie modificada. Adaptado de Lee et al.⁴¹

Como se observa en la Figura 4, se ha desarrollado un método de ingeniería de vesículas extracelulares en el que se introducen en la membrana celular lípidos modificados con azida mediante liposomas fusogénicos. De esta manera, los exosomas producidos por las células incluyen los “azide-lipid” en su superficie y son capaces de funcionalizarse con péptidos diana de forma selectiva mediante uniones basadas en química clic.⁴¹ No obstante, aunque los exosomas contengan propiedades útiles para la transfección y un gran potencial terapéutico, al ser producidos por células, su producción a gran escala continúa siendo un reto.

4.1.4 Estearosomas

Los estearosomas son liposomas catiónicos ricos en esteroides y estearilamina que surgen como alternativas más estables a los liposomas fosfolipídicos puesto que son más resistentes a la oxidación e hidrólisis. Los estearosomas han sido utilizados para la administración de siRNA para regular la expresión de la proteína nogina. Por ejemplo, el desarrollo de estos estearosomas cargados con un siRNA que es inhibidor del gen NOG (codificante de nogina) constituye un eficaz método de inhibición de genes reguladores de la osteogénesis (Figura 2.e).⁴²

4.2 Polímeros y dendrímeros

Los polímeros sintéticos son macromoléculas formadas por múltiples unidades repetitivas llamadas monómeros y se caracterizan por su alto peso molecular. Han resultado ser prometedores para la transfección génica gracias a una versatilidad estructural que les permite el reconocimiento y la translocación a través de la

membrana, sumado a la posibilidad de su producción a gran escala. Se han diseñado polímeros que son capaces de desensamblarse selectivamente en respuesta a cambios de pH, a agentes reductores y enzimas (“smart delivery”).

4.2.1 Liberación de genes desde partículas poliméricas mediado por el pH

El diseño de polímeros biocompatibles puede incluir grupos funcionales (tales como hidrazonas o ésteres) capaces de degradarse selectivamente a un pH concreto (grupos pH-sensibles). Suelen ser grupos funcionales estables a pH fisiológico 7.4 (asegurando la biodistribución) que se degradan a un pH ácido (microambiente tumoral o lisosomas) y liberan la carga terapéutica de forma selectiva. En el campo de “gene delivery”, se han desarrollado nanopartículas poliméricas que penetran eficazmente en los tumores. En un trabajo reciente, se diseñó un sistema compuesto por un polímero PEGilado con una característica ultra pH-sensible (pKa cercano al pH endosomal) y un péptido penetrante de tumores iRGD (Figura 5). Este sistema responde a pequeños cambios de pH y produce el desensamblaje para la liberación del siRNA al citoplasma *in vivo* que inhibe el crecimiento tumoral mediante el silenciamiento génico.⁴³

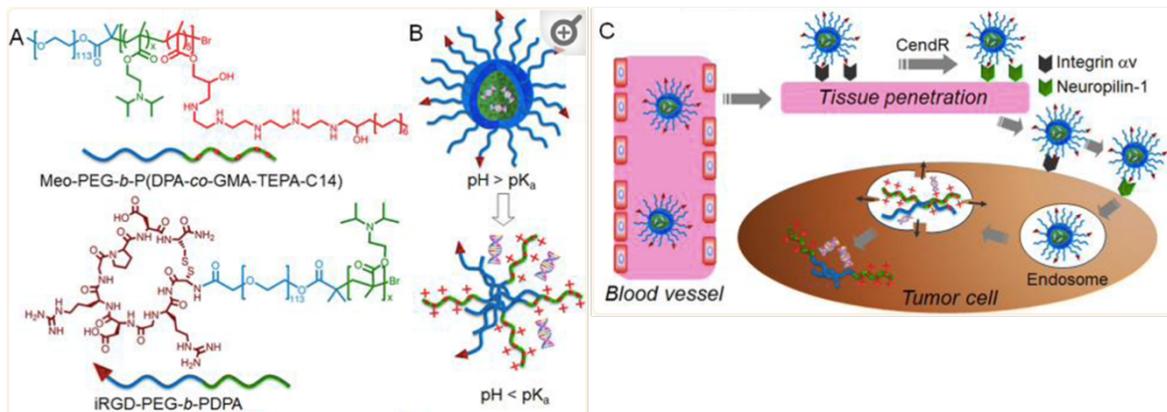


Figura 5. Esquema general del diseño de una nanopartícula polimérica cuya carga genética se libera de manera eficiente en el entorno lisosomal por la disrupción de grupos pH-sensibles. Adaptado del trabajo de Montenegro et al.¹⁸

4.2.2 Liberación de genes desde partículas poliméricas mediado por reacciones redox

Otro método para la liberación selectiva de ácidos nucleicos en formulaciones poliméricas es la rotura selectiva del enlace disulfuro en polímeros capaces de desensamblarse en un entorno citosólico reductor como en el microambiente tumoral.

En un trabajo reciente, se ha empleado el disulfuro de la polietilenimina (PEI), mediante la funcionalización del ligando Zn-DDAC, se transformó en un vector eficaz y seguro para las células aumentando la afinidad por el DNA, la unión a la membrana y la eficacia de transfección del PEI. El DNA es condensado por Zn-PD y el polímero formulado presenta una buena captación celular gracias a la gran afinidad entre el ligando coordinado con Zn y los componentes fosforilados. Una vez en el citoplasma, el DNA se libera de forma controlada por la disociación del polímero a través de la rotura de enlaces disulfuro desencadenada por el glutatión transferasa (GSH) (Figura 6).⁴⁴

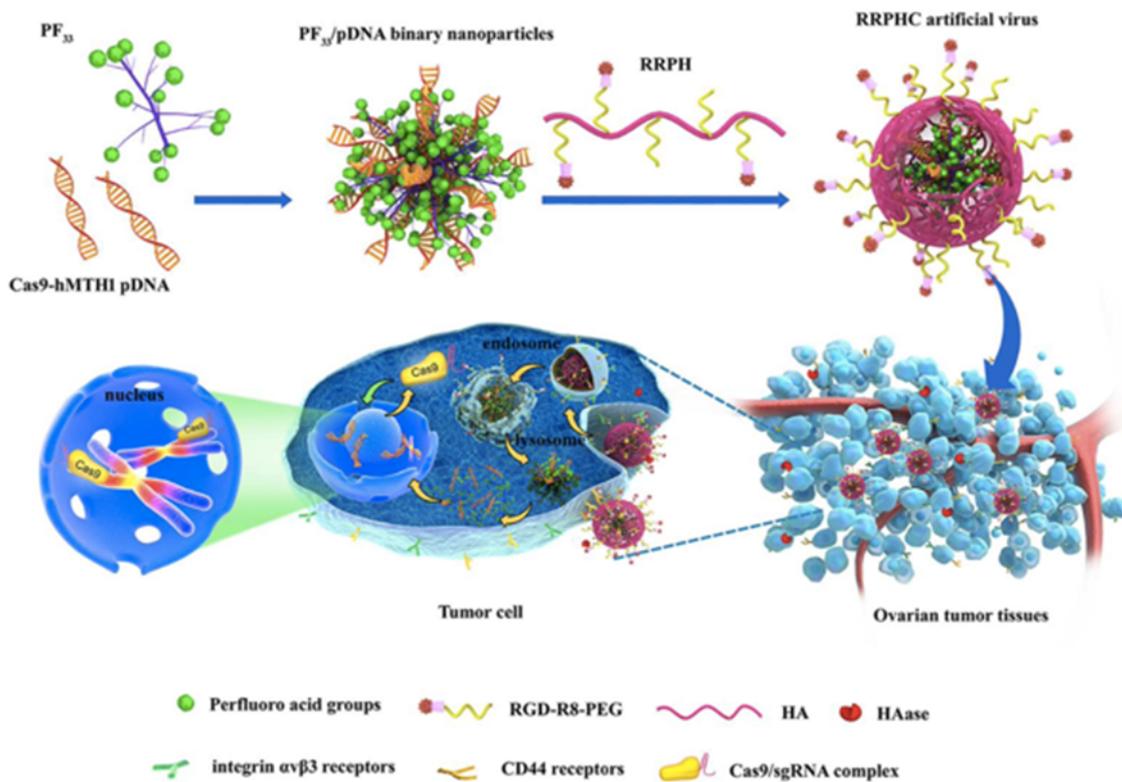


Figura 6. Esquema del sistema de entrega mediante la funcionalización del ligando Zn-DDAC. El DNA es condensado mediante Zn-PD y dentro del citoplasma, el DNA es liberado por la disociación del complejo desencadenado por GSH, lo que facilita una alta eficiencia de transfección. Adaptado del trabajo de Liu, S. et al.⁴⁴

En una estrategia distinta, se desarrolló un sistema de entrega con CRISPR-Cas9 *in vivo* para una edición dirigida del genoma (Figura 6). Los plásmidos CRISPR-Cas9 fueron compactados con polímeros fluorados PF33 para la formación del núcleo cubierto por el polímero funcional RRPHC formado por PEG, HA y péptido en tándem R8-RGD para crear un virus artificial RRPHC (multifuncional nucleus-targeting “core-shell” artificial virus). El PF33 proporcionó al virus una mayor capacidad de escape endosomal y una alta eficacia de transfección mientras el RRPHC mejoró su estabilidad y capacidad de penetración. Una vez alcanzado el citoplasma, el polímero fue degradado selectivamente por la hialuronidasa, sobreexpresada en entornos tumorales, permitiendo la administración de plásmidos grandes *in vivo*.⁴⁵

4.2.3 Dendrímeros

Los dendrímeros son polímeros sintéticos versátiles y tridimensionales que presentan estructuras regulares bien definidas y muy ramificadas. Su tamaño y geometría pueden ser controlados específicamente en su síntesis lo que les permite ser utilizados como vectores genéticos.

Entre ellos, destacan las propiedades de una serie de fluorodendrimeros de bajo peso molecular con una transfección eficaz, buena estabilidad sérica y toxicidad mínima (Figura 7). Estos dendrimeros de poli(amidoamina) (PAMAM) perfluorados son capaces de condensar el DNA plasmídico en proporciones muy bajas de nitrógeno-fósforo, reduciendo su carga positiva, disminuyendo la toxicidad y aumentando la eficacia de la transfección. Además, a diferencia de los lípidos convencionales, las cadenas de fluorocarbono son doblemente hidrofóbicas y lipofóbicas. Esta propiedad disminuye la interacción con las membranas y aumenta su capacidad de penetrar en los tejidos.⁴³

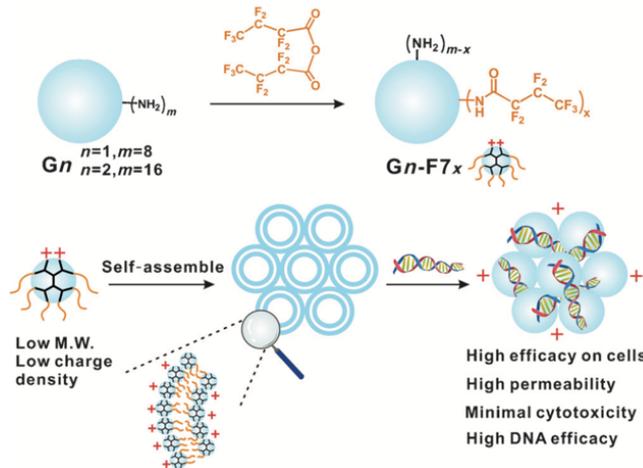


Figura 7. Esquema representativo de la estructura de los polimeros fluorocarbonados. Adaptado del trabajo de Wang et al.⁴³

4.3 Proteínas Carrier

Las nanopartículas proteicas están formadas por biomoléculas que presentan propiedades como la biodegradabilidad, una mayor estabilidad durante su biodistribución *in vivo* y la posibilidad de controlar su tamaño.⁴⁶ Estas características permiten que sean utilizadas como vehículos proteicos para la protección y transporte de los oligonucleótidos. De hecho, la encapsulación de ácidos nucleicos en proteínas es una estrategia extendida en la naturaleza (Figura 2.a).

4.3.1 Partículas “virus-like” (VLPs).

Las VLPs son pequeñas partículas esféricas altamente organizadas que se autoensamblan a partir de antígenos estructurales derivados de los virus. Además de ser estables y muy versátiles son capaces de inducir respuestas del sistema inmune sin causar infección puesto que no contienen el material genético del virus.⁴⁷

Un caso particular que resulta del interés es el gen neuronal Arc que codifica una proteína capaz de autoensamblarse en cápsides similares a las de los virus para encapsular RNA. Las cápsides de Arc purificadas son endocitadas por las neuronas y tienen la capacidad de transferir el mRNA de Arc al citoplasma (Figura 8).⁴⁸

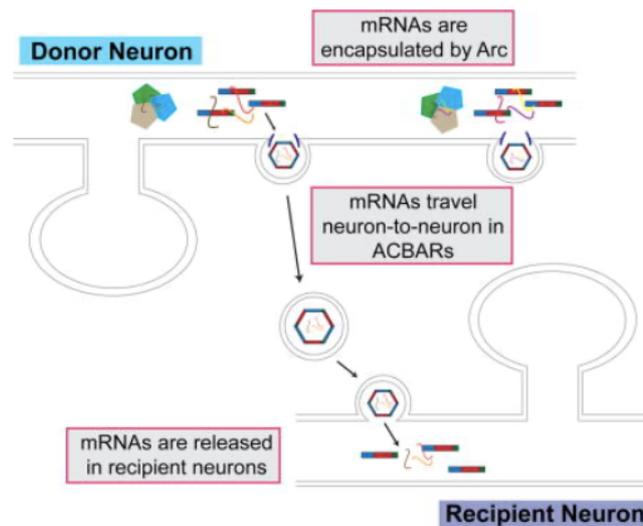


Figura 8. Esquema representativo del sistema Arc para la transferencia de mRNA entre neuronas. Adaptado de Pastuzyn et al. ⁴⁸

Además, las partículas virus-like son capaces de empaquetar y liberar DNA exógeno en células humanas para la expresión génica. En una estrategia de encapsulación *in vivo* de DNA, se utilizaron partículas virus-like de JCV (John Cunningham Virus) para inhibir la proliferación de células de cáncer de colon en un modelo de ratón. La estrategia terapéutica se ha basado en la transferencia de un gen suicida que inhibió el crecimiento tumoral en ratones.⁴⁹

4.3.2 Proteínas de unión al RNA

Los dominios de unión a RNA de doble cadena (dsRNA) son comunes en una gran variedad de proteínas pudiendo ser utilizadas para la protección y administración de siRNA (Figura. 1a).

Se ha desarrollado un método de administración de siRNA mediante una proteína de fusión con dominio unión a siRNA (PTD-DRBD) y otro de transducción peptídica. Las proteínas DRBD se unen a los siRNA enmascarando la carga negativa del ácido nucleico y permitiendo la captación celular mediada por receptor. Estos sistemas han logrado inducir rápidas respuestas terapéuticas incluso en células difíciles de transfectar como células T, HUVECs y hESCs sin generar citotoxicidad.⁵⁰

4.3.3 Potenciadores de la biodisponibilidad

Los grandes complejos proteicos con carga genética formados por la fusión de proteínas específicas a un ácido nucleico eluden el aclaramiento renal prolongando su semivida y mejorando la farmacocinética. Por ejemplo, la unión de nucleótidos a anticuerpos o a albúmina aumenta la biodisponibilidad de los siRNA.

Recientemente se han modificado siRNA con lípidos (siRNA-L2) que mejoran la unión del ácido nucleico a la albúmina *in situ* y se aplican a la terapia oncogénica. Al comparar el siRNA no modificado con el siRNA-L2, este último presentó una eliminación renal menor,

una semivida 6 veces mayor, una biodisponibilidad significativamente mayor y una captación del 99% de las células tumorales. Por lo tanto, un siRNA modificado transportado por la albúmina endógena da lugar a propiedades farmacocinéticas mejoradas que se traducen en una mayor cantidad y homogeneidad de la acumulación tumoral.⁵¹

4.4 Nanopartículas y nanotubos de carbono

El uso de partículas inorgánicas comenzó en los años 70 con el transporte de plásmidos y a partir de entonces las nanopartículas han evolucionado drásticamente logrando mejoras significativas en sus características y funciones.

Actualmente las nanoestructuras de carbono tienen aplicaciones prometedoras como herramientas diagnósticas y terapéuticas. La modificación del tamaño y superficie de estas partículas mejora su toxicidad por lo que las modificaciones químicas son fundamentales para optimizar sus propiedades biológicas.

Para su aplicación como vectores sintéticos, estos nanotubos pueden modificarse covalentemente mediante la incorporación de oligoetilenglicol (que contiene aminas terminales para la unión del DNA). Se ha observado que los nanotubos de carbono funcionalizados con este grupo funcional son capaces de asociarse con DNA plasmídico mediante interacciones electrostáticas y atravesar las membranas celulares. Además, el DNA plasmídico asociado a nanotubos penetra en las células de manera eficaz, observando niveles de expresión génica 10 veces más altos que los obtenidos con el DNA no asociado (Figura 9.a).⁵²

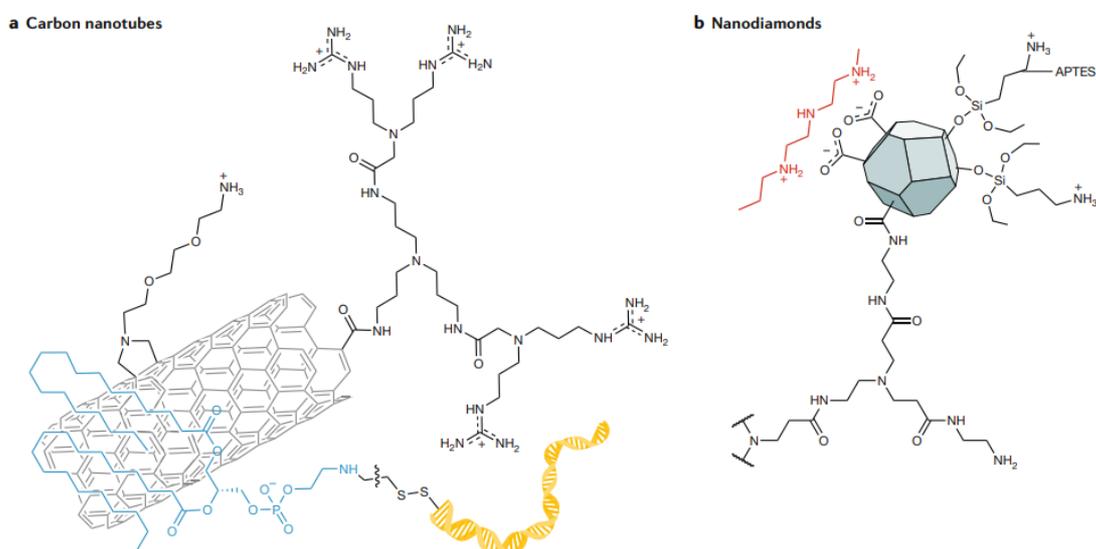


Figura 9. Estrategias de delivery de ácidos nucleicos con nanoestructuras de carbono.

En otro trabajo, se sintetizaron una serie de dendrones que contenían grupos amonio o guanidina en sus terminaciones. La funcionalización de los nanotubos se realizó mediante modificaciones covalentes. Los nanotubos modificados mediante amidación fueron más eficientes en la complejación del siRNA en comparación con los funcionalizados mediante química click. Por último, se concluyó que los derivados de

amonio presentaban la mejor captación de siRNA y silenciamiento de genes. Asimismo, la baja toxicidad de estos derivados sugiere una prometedora relevancia como sistema de liberación de genes.⁵³

Alternativamente a las modificaciones covalentes, las interacciones hidrofóbicas entre los nanotubos de carbono y los lípido-PEG producen una estabilización de los nanotubos permitiendo su funcionalización a través de enlaces disulfuro con el siRNA. Además, dado que la biodistribución de los nanotubos está influenciada tanto por su anchura como por su longitud, estas propiedades pueden usarse para la liberación selectiva de genes en tipos celulares o tejidos concretos. Se ha demostrado que los nanotubos de carbono rígidos y flexibles puede acortarse mediante métodos de oxidación aumentando así su hidrofiliidad, lo que mejora su dispersión y finalmente incrementa la internalización celular.⁵⁴

Otro tipo de nanoestructuras de carbono empleadas en gene delivery son los fullerenos catiónicos, como el tetra(piperazino)fullereno. Estas moléculas son capaces de condensar el DNA de doble cadena para mejorar su internalización en la célula. Además, su naturaleza hidrófoba permite a los fullerenos formar un complejo estable con el DNA y evitar la digestión por las nucleasas con una baja toxicidad.⁵⁵ Finalmente, los nanodiamantes son alótropos de carbono biocompatibles que tienen la capacidad de formar complejos con ácidos nucleicos cuando son decorados con aminas o polímeros catiónicos (Figura 5b). Tanto sus propiedades fisicoquímicas como su biocompatibilidad y escasa citotoxicidad permiten su aplicación para la liberación de genes. Estos entran en las células por medio de la endocitosis y logran escapar mediante la desestabilización de la membrana endosomal. Una vez en el citosol liberan el gen transportado (Figura 9.b).⁵⁶

4.5 Nanopartículas metálicas: nanopartículas de oro en gene delivery

Las nanopartículas metálicas y su biocorona proteica son objeto de investigación desde hace tiempo en el campo de la nanotecnología. Algunas de las ventajas para su aplicación en medicina son la facilidad para controlar sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma y carga), su capacidad de respuesta a estímulos externos y la accesibilidad en la funcionalización de su superficie con moléculas bioactivas. En la actualidad se emplean varios métodos sintéticos para generar estas partículas con propiedades bien definidas.

El método de funcionalización más empleado de nanopartículas de oro con ácidos nucleicos se realiza a través de un enlace tiol-oro. Para lograr la entrega de siRNA a tumores sólidos se han desarrollado nanopartículas de oro ensambladas a un complejo de polímeros (uPIC-AuNP) mediante un proceso de ensamblaje que consta de dos pasos: primero la formación de uPIC a partir de moléculas de siRNA terapéutico y el catiónero en bloque, el péptido RGD cíclico (cRGD) y posteriormente la decoración superficial de una nanopartícula de oro (AuNP) de 20 nm con uPICs. La nanopartícula metálica resultante logró la unión selectiva a células cancerosas. La nanopartícula (cRGD-uPIC-AuNP) logró una capacidad de silenciamiento génico significativamente mayor en el tumor HeLa subcutáneo gracias a la selectividad del ligando.⁵⁷

De forma alternativa se ha descrito una combinación de terapia génica, farmacológica y fototerapéutica para el tratamiento del cáncer de colon. Se incrustaron nanopartículas de oro en hidrogeles mezclando nanorods de oro decorados con bevacizumab y el péptido TCP-1 dirigido contra el cáncer colorrectal junto con nanoesferas de oro cubiertas con siRNA (Figura 10). Las nanopartículas esféricas se utilizaron para administrar siRNA para silenciar la expresión del oncogen Kras, mientras que los nanorods provocan la liberación del agente quimioterapéutico, así como un daño celular inducido térmicamente. Esta terapia combinada logró la remisión completa del cáncer de colon no resecado en un modelo de ratón y a la ausencia de recidiva cuando se aplica tras la resección tumoral.⁵⁸

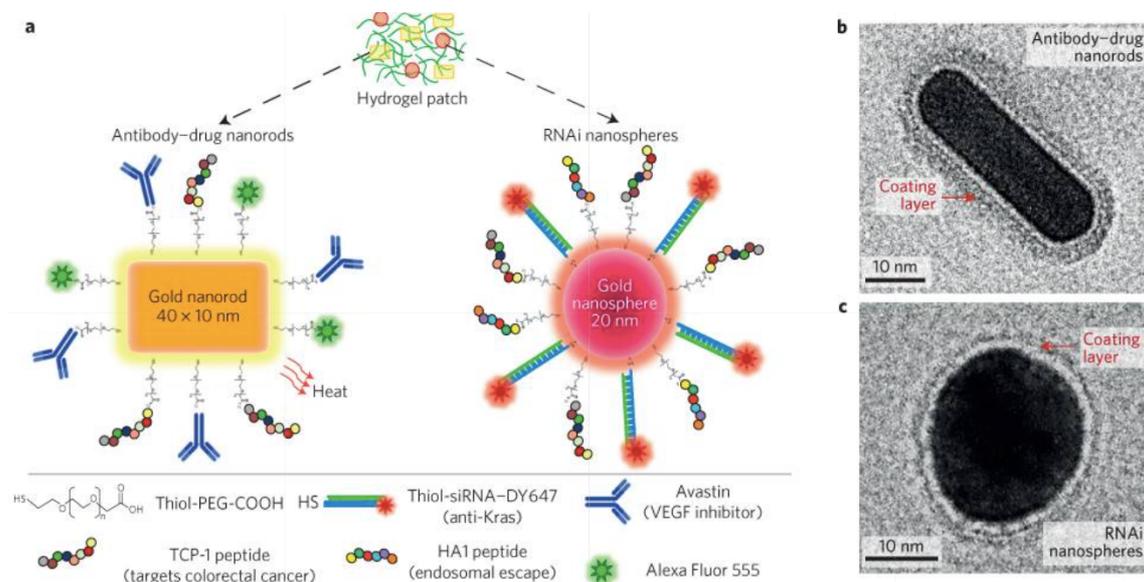


Figura 10. Esquema de la terapia local de triple combinación para el tratamiento del cáncer de colon. a. Nanorods de oro junto con fármacos y nanoesferas de oro cubiertas por siRNA incrustados en hidrogeles para su administración local. b,c. Imágenes de nanorods y nanoesferas de oro obtenidas mediante microscopios electrónicos de transmisión. Adaptado del trabajo de Conde et al.⁵⁸

5 Aplicación clínica de la terapia génica: el caso de las terapias CAR-T

5.1 Terapia de células CAR-T

Entre las aplicaciones clínicas de la terapia génica, la terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) ha demostrado ser una estrategia revolucionaria, ya que produce respuestas clínicas extraordinarias principalmente en neoplasias hematológicas como la leucemia linfocítica aguda de células B, el linfoma no Hodgkin y el mieloma múltiple.⁵⁹

Los CAR son receptores sintéticos que permiten a los linfocitos T reconocer y eliminar las células que expresen un antígeno diana específico sin procesamiento ni presentación de antígenos. La unión de los CAR a los antígenos expresados en las células diana es independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) lo que da lugar a una

activación general de las células T y a una potente respuesta antitumoral. Esta terapia se basa en el aislamiento de linfocitos T de la circulación para posteriormente modificarlos genéticamente *ex vivo* con el fin de que expresen los CAR y permitiendo de esta forma a los linfocitos T reconocer las células diana cancerosas.⁶⁰

La producción de células CAR-T requiere varios pasos. Primero, mediante la leucoféresis, se extraen leucocitos de la sangre periférica del paciente o del donante y posteriormente se lleva a cabo un aislamiento y separación de las células T. A continuación, es necesario realizar un cultivo *in vitro* de los linfocitos T aislados para activarlos. Este proceso requiere entre otros, células presentadoras de antígenos (APC) o anticuerpos anti-CD3 en combinación con factores de crecimiento como la IL-2 que induce un rápido crecimiento de las células T. En la práctica clínica, los CAR se codifican gracias a vectores virales que guían el RNA para que se transcriba inversamente en DNA y pueda integrarse en el genoma de las células T cultivadas. Durante el proceso de activación, el vector viral es eliminado del cultivo. Los vectores que se utilizan con más frecuencia son los lentivirales debido a que tienen un perfil de lugar de integración seguro. Posteriormente, las células CAR-T son sometidas a una amplia expansión *in vitro* y una vez alcanzan el número necesario para los usos clínicos, el paciente recibe quimioterapia linfodeplectora para dejar espacio a las células CAR-T. Finalmente, estas son reinfundidas en el paciente y proliferan rápidamente para generar respuestas inmunitarias antitumorales *in vivo* (Figura 11).^{59,61}

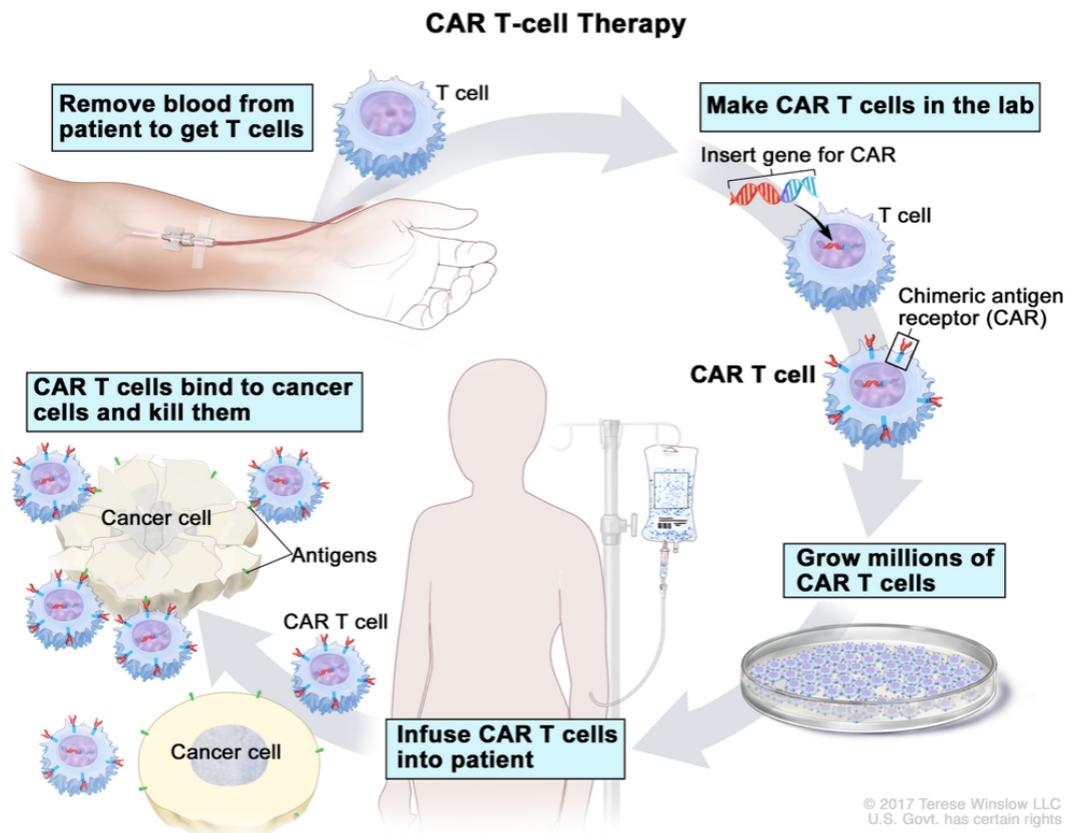


Figura 11. Esquema de la terapia con células CAR-T. Las células T de un paciente se modifican para que sean capaces de unirse a las células cancerosas y las eliminen. Se extraen los leucocitos, incluidas las células T, de la sangre de una vena periférica del paciente. A continuación, el gen del CAR se inserta en las células T in vitro y se cultivan millones de células CAR-T que posteriormente se administran al paciente mediante infusión. Estas células son capaces de unirse a un antígeno de células cancerosas y destruirlas.⁶²

5.2 Las terapias CAR-T aprobadas para uso clínico

La terapia de células CAR-T ha revolucionado el tratamiento de las neoplasias hematológicas y desde 2017 seis productos han sido aprobados por la FDA: tisagenlecleucel (Kymriah; Novartis), axicabtagene ciloleucel (Yescarta; Gilead), brexucabtagene autoleucel (Tecartus; Gilead), lisocabtagene maraleucel (Breyanzi; Bristol Myers Squibb), idecabtagene vicleucel (Abecma; Bristol Myers Squibb y Bluebird Bio), y ciltacabtagene autoleucel (Carvykti; Legend y Janssen).

- **Tisagenlecleucel (Kymriah; Novartis Pharmaceuticals).** Es una inmunoterapia autóloga de células T modificadas genéticamente y dirigidas frente a CD19 y en 30 de agosto de 2017 se convirtió en la primera terapia de células CAR-T aprobada por la FDA. Fue aprobada para tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) precursora de células B refractaria en segunda o posteriores recaídas de pacientes de hasta 25 años. En el estudio ELIANA la tasa de remisión completa fue del 63% (ERM <0,01%) y el síndrome de liberación de citoquinas junto con los acontecimientos neurológicos fueron los efectos adversos graves notificados.^{63,64}

- **Axicabtagene ciloleucel (Yescarta; Gilead).** Consiste en un tratamiento autólogo con células CAR-T anti-CD19 que está aprobado desde octubre de 2017 por la FDA en pacientes adultos con linfoma de células B grandes en recaída o resistente al tratamiento que hayan recibido al menos dos tratamientos sistémicos previos. En el estudio ZUMA-1, la tasa de remisión completa fue del 51% y el síndrome de liberación de citoquinas y las toxicidades neurológicas se produjeron en el 94% y el 87% de los pacientes respectivamente.^{65,66}
- **Brexucabtagene autoleucel (Tecartus; Gilead).** Es una terapia de células CAR-T de segunda generación dirigida a CD19 y aprobada en julio de 2020 para el linfoma de células del manto (LCM) en recaída o refractario (R/R). La aprobación se basó en el ensayo de fase II ZUMA-2 y mostró una tasa de respuesta completa del 67%. Sin embargo, se asocia a una gran toxicidad de gravedad variable afectando a múltiples sistemas. Los acontecimientos adversos más frecuentes fueron las citopenias (94%). Estas incluyen la neutropenia (85%), trombocitopenia (51%) y anemia (50%). El síndrome de liberación de citoquinas se produjo en el 62 % de pacientes y el 63% experimentó eventos neurológicos.^{67,68}
- **Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi; Bristol Myers Squibb).** Es un producto de células CAR-T de segunda generación dirigido contra la proteína de superficie CD19. Desde febrero de 2021 está aprobado para el tratamiento del linfoma de células B grandes en recaída o refractario tras dos líneas de tratamiento y se está evaluando para el tratamiento de otros linfomas de células B. La aprobación se basa en el ensayo TRANSCEND con una tasa de respuesta completa del 53%. Los acontecimientos adversos más frecuentes del tratamiento fueron la neutropenia (63%), anemia (48%), fatiga (44%) y síndrome de liberación de citoquinas (42%).^{69,70}
- **Idecabtagene vicleucel (Abecma; Bristol Myers Squibb y Bluebird Bio).** Se trata de una nueva terapia de células CAR-T dirigida contra el antígeno de maduración de células B (BCMA). Ha mostrado actividad clínica con los efectos tóxicos esperados en pacientes con mieloma múltiple recidivante y refractario en el ensayo KarMMA obteniendo recientemente la aprobación de la FDA. Se observó una respuesta completa o mejor en 1 de 4 pacientes (25%), en 20 de 70 pacientes (29%) y en 21 de 54 pacientes (39%). Los efectos tóxicos más frecuentes entre los pacientes tratados fueron neutropenia (91%), anemia (70%) y trombocitopenia (63%). Además, se notificó síndrome de liberación de citoquinas (84%) y se desarrollaron efectos neurotóxicos en el 18% de los pacientes.⁷¹
- **Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti; Legend y Janssen).** Es el segundo producto de células CAR-T anti-BCMA aprobado después de idecabtagene vicleucel para tratar a pacientes con mieloma. Consiste en una terapia de células CAR-T que expresa dos dominios de unión únicos dirigidos al BCMA que demostró excelentes respuestas en pacientes muy pretratados con mieloma múltiple en recaída/refractario en el estudio CARTITUDE-1 por lo que fue aprobado por la FDA el 28 de febrero de 2022. La tasa de respuesta global fue del 98% y un 80% de los pacientes alcanzaron una respuesta completa estricta. Los acontecimientos adversos hematológicos fueron frecuentes: neutropenia (95%), anemia (68%), leucopenia (61%), trombocitopenia (60%) y linfopenia (50%). El síndrome de liberación de citocinas se produjo en el 95% de los pacientes y neurotoxicidad por células CAR-T en el 21%.⁷²⁻⁷⁴

5.3 El uso de vectores no virales en estrategias CAR-T

Hasta el momento, la producción de células CAR-T se ha basado principalmente en vectores virales, no obstante, tienen varias desventajas que incluyen la mutagenicidad, los altos costes de fabricación y un gran porcentaje de efectos adversos. Por lo tanto, el desarrollo de métodos alternativos basados en vectores sintéticos es de gran interés para reemplazar la transducción viral en la terapia de células T. Aunque el uso de vectores no virales haya sido desarrollado sobre todo para la administración de fármacos *in vivo*, en la actualidad está siendo evaluado para la ingeniería de células T *ex vivo*.⁷⁵

Durante mucho tiempo se pensó que las células en suspensión eran refractarias a la transfección mediante vectores no virales por su pobre captación endocítica y su incapacidad para escapar de los endosomas. Sin embargo, las mejoras en el diseño de dichos vectores han arrojado algunos resultados alentadores. Los nanotransportadores lipídicos y poliméricos han demostrado su aplicabilidad para moléculas efectoras como proteínas, mRNA, pDNA y siRNA. A continuación, se discutirán los transportadores y su uso para transfectar células T *in vitro*.^{25,76}

5.3.1 Nanopartículas lipídicas en terapias CAR-T

Las nanopartículas lipídicas son uno de los métodos no virales que más se han utilizado para la transfección de ácidos nucleicos y se han investigado recientemente para la terapia de células T. Los trabajos publicados sobre las células T *ex vivo* se han centrado en mejorar la entrega al citosol, por ejemplo, por medio de la funcionalización con sustancias diana para unirse mejor a las membranas celulares y favorecer la captación endocítica. También se han tratado de optimizar los transportadores lipídicos mediante la incorporación de materiales que facilitan el escape endosomal hacia el citoplasma.⁷⁷

Recientemente, Billingsley *et al* utilizaron lípidos ionizables para la entrega de mRNA en células T humanas para la producción de células CAR-T. Los resultados mostraron una reducción de la citotoxicidad en más de la mitad en comparación con la electroporación (ensayo CellTiter-Glo), demostrándose niveles comparables de expresión de CAR y la misma capacidad de destrucción tumoral. Las nanopartículas lipídicas son capaces de condensar ácidos nucleicos grandes protegiéndolos de la degradación de las nucleasas, lo que mejora la capacidad de transfección de las células T. Otra ventaja es la fabricación accesible de las nanopartículas lipídicas. Sin embargo, solo un escaso número de informes han examinado su aplicación en las células T *ex vivo*, por lo que es necesario un análisis adicional de su inmunogenicidad y eficacia. Además, para promover la endocitosis de las nanopartículas lipídicas se requiere la estimulación de las células T, lo que aumenta el riesgo de su diferenciación terminal.⁷⁸

5.3.2 Nanopartículas poliméricas en terapias CAR-T

A pesar de la extensa investigación de los nanotransportadores poliméricos catiónicos como formulaciones no virales para la administración de genes, su aplicación en la terapia de células T ha permanecido inexplorada durante mucho tiempo. Recientemente se ha examinado la polietilenimina (PEI), uno de los agentes de transfección polimérica más popular, para la ingeniería de células T. Xie *et al*, mediante conjugados de transferrina-PEI, administraron de manera efectiva siRNA en células T

humanas activadas logrando un silenciamiento >50%. Los receptores de transferrina se expresaron después de que las células T se activarán permitiendo que las nanopartículas poliméricas fueran endocitadas mediante los receptores. Posteriormente se produjo la transfección de siRNA y el consiguiente silenciamiento.⁷⁹

Aunque en comparación con las nanopartículas lipídicas, las nanopartículas poliméricas no estén tan desarrolladas en la práctica clínica, son prometedoras como vehículos no virales en la ingeniería de las células T *ex vivo*. Tienen una serie de ventajas que incluyen la biocompatibilidad, la adaptabilidad química y una prolongada vida útil. Estos nanotransportadores también tienen la capacidad de transfectar un número considerable de células T simultáneamente, son fáciles de usar, económicos y presentan una menor toxicidad que las nanopartículas lipídicas. Sin embargo, los vectores poliméricos se limitan a la transfección de ácidos nucleicos lo que dificulta su uso para la administración de otras moléculas efectoras como las proteínas. Además, en general, es necesaria la estimulación de las células T para lograr la captación eficiente del transportador y aún se desconocen sus efectos sobre la funcionalidad de las células T.⁸⁰

6 Conclusiones

1. Los vectores virales presentan desventajas como la inmunogenicidad y una disminuida capacidad de carga que obligan a buscar enfoques de transfección no virales.
2. Las mejoras en los métodos sintéticos de biomateriales han permitido desarrollar una gran variedad de vectores no virales para la administración de genes que han resultado ser muy prometedores para el futuro de la nanomedicina y la terapia génica.
3. A pesar de los grandes avances de la última década en la producción de nanomateriales sintéticos para la transfección de células, aún deben superarse importantes obstáculos para poder ampliar su uso en futuras aplicaciones terapéuticas.
4. La terapia CAR-T ha obtenido resultados excepcionales en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, aunque los productos aprobados no están exentos de efectos adversos.
5. Para hacer frente a las desventajas de los vectores virales en la producción de las células CAR-T se están desarrollando tecnologías de transfección no virales como los nanotransportadores lipídicos y poliméricos.
6. El uso de nanopartículas poliméricas y lipídicas como vectores virales para la transfección de las células es limitado debido a la necesidad de estimulación de las células T.

7 Bibliografía

- (1) Rodgers, P.; Chun, A.; Cantrill, S.; Thomas, J. Small Is Different. *Nature Nanotechnology* 2006 1:1 **2006**, 1 (1), 1–1.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2006.82>.
- (2) Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48 (1), 60–103.
<https://doi.org/10.1002/ANIE.200802248>.
- (3) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nature Nanotechnology* 2007 2:12 **2007**, 2 (12), 751–760.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.
- (4) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953 171:4356 **1953**, 171 (4356), 737–738.
<https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (5) Anderson, A. C.; Malinowski, M. E.; Rev, P.; Cotts, E. J.; Miliotis, D. M.; Northrop, G. A.; Kneezel, G. A.; Granato, A. V.; Bev, P. B.; Binning, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys Rev Lett* **1982**, 49 (1), 57. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.57>.
- (6) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **1986**, 56 (9), 930–933.
<https://doi.org/10.1103/PHYSREVLETT.56.930/FIGURE/1/THUMB>.
- (7) Kinnear, C.; Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. *Chem Rev* **2017**, 117 (17), 11476–11521.
https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00194/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2017-001946_0019.GIF.
- (8) Weissig, V.; Pettinger, T. K.; Murdock, N. Nanopharmaceuticals (Part 1): Products on the Market. *Int J Nanomedicine* **2014**, 9 (1), 4357–4373.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S46900>.
- (9) Yuan, Y.; Gu, Z.; Yao, C.; Luo, D.; Yang, D. Nucleic Acid-Based Functional Nanomaterials as Advanced Cancer Therapeutics. *Small* **2019**, 15 (26), 1900172.
<https://doi.org/10.1002/SMLL.201900172>.
- (10) Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 112 **2019**, 25 (1), 112.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010112>.

- (11) *What is Gene Therapy? | FDA*. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy?_ga=2.137993072.1935433725.1671647709-1497552649.1671305814 (accessed 2023-05-10).
- (12) Avery, O. T.; Macleod, C. M.; McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine* **1944**, *79* (2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/JEM.79.2.137>.
- (13) Temin, H. M. Mixed Infection with Two Types of Rous Sarcoma Virus. *Virology* **1961**, *13* (2), 158–163. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(61\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(61)90049-6).
- (14) Rogers, S.; Pfuderer, P. Use of Viruses as Carriers of Added Genetic Information. *Nature* **1968**, *219* (5155), 749–751. <https://doi.org/10.1038/219749a0>.
- (15) Silva, G. E. Avances En Terapia Génica En Humanos: Algunos Conceptos Básicos y Un Recorrido Histórico. *Revista Médica Clínica Las Condes* **2022**, *33* (2), 109–118. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2022.03.001>.
- (16) Alnasser, S. M. Review on Mechanistic Strategy of Gene Therapy in the Treatment of Disease. *Gene* **2021**, *769*, 145246. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.145246>.
- (17) Jeyanathan, M.; Afkhami, S.; Smaill, F.; Miller, M. S.; Lichty, B. D.; Xing, Z. Immunological Considerations for COVID-19 Vaccine Strategies. *Nature Reviews Immunology* **2020**, *20* (10), 615–632. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00434-6>.
- (18) Lostalé-Seijo, I.; Montenegro, J. Synthetic Materials at the Forefront of Gene Delivery. *Nature Reviews Chemistry* **2018**, *2* (10), 258–277. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0039-1>.
- (19) Sarett, S. M.; Werfel, T. A.; Lee, L.; Jackson, M. A.; Kilchrist, K. V.; Brantley-Sieders, D.; Duvall, C. L. Lipophilic siRNA Targets Albumin in Situ and Promotes Bioavailability, Tumor Penetration, and Carrier-Free Gene Silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (32), E6490–E6497. https://doi.org/10.1073/PNAS.1621240114/SUPPL_FILE/PNAS.1621240114.SAPP.PDF.
- (20) Oude Blenke, E. E.; Van Den Dikkenberg, J.; Van Kolck, B.; Kros, A.; Mastrobattista, E. Coiled Coil Interactions for the Targeting of Liposomes for Nucleic Acid Delivery. *Nanoscale* **2016**, *8* (16), 8955–8965. <https://doi.org/10.1039/C6NR00711B>.
- (21) Yang, J.; Bahreman, A.; Daudey, G.; Bussmann, J.; Olsthoorn, R. C. L.; Kros, A. Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes.

- ACS Cent Sci* **2016**, 2 (9), 621–630.
https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.6B00172/ASSET/IMAGES/LARGE/OC-2016-001725_0007.JPEG.
- (22) Chiappini, C.; De Rosa, E.; Martinez, J. O.; Liu, X.; Steele, J.; Stevens, M. M.; Tasciotti, E. Biodegradable Silicon Nanoneedles Delivering Nucleic Acids Intracellularly Induce Localized in Vivo Neovascularization. *Nature Materials* **2014** 14:5 **2015**, 14 (5), 532–539. <https://doi.org/10.1038/nmat4249>.
- (23) Chen, L.; Wang, M.; Ou, W. Efficient Gene Transfer Using the Human JC Virus-like Particle That Inhibits Human Colon Adenocarcinoma Growth in a Nude Mouse Model. *Gene Ther.* **2010**, 17, 1033–1041.
- (24) Medina, S. H.; Miller, S. E.; Keim, A. I.; Gorka, A. P.; Schnermann, M. J.; Schneider, J. P. An Intrinsically Disordered Peptide Facilitates Non-Endosomal Cell Entry. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55 (10), 3369–3372. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201510518>.
- (25) Smith, T. T.; Stephan, S. B.; Moffett, H. F.; McKnight, L. E.; Ji, W.; Reiman, D.; Bonagofski, E.; Wohlfahrt, M. E.; Pillai, S. P. S.; Stephan, M. T. In Situ Programming of Leukaemia-Specific T Cells Using Synthetic DNA Nanocarriers. *Nature Nanotechnology* **2017** 12:8 **2017**, 12 (8), 813–820. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.57>.
- (26) Friehs, K. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2004**, 86, 47–82. <https://doi.org/10.1007/B12440/COVER>.
- (27) Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanomedicine. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912273> **2010**, 363 (25), 2434–2443. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0912273>.
- (28) Chan, J. H. P.; Lim, S.; Wong, W. S. F. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2006**, 33 (5–6), 533–540. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2006.04403.X>.
- (29) Ji, L.; Chen, X. Regulation of Small RNA Stability: Methylation and Beyond. *Cell Research* **2012** 22:4 **2012**, 22 (4), 624–636. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.36>.
- (30) Huang, P. J. J.; Liu, J. In Vitro Selection of Chemically Modified DNAzymes. *ChemistryOpen* **2020**, 9 (10), 1046–1059. <https://doi.org/10.1002/OPEN.202000134>.
- (31) Jin, Y. Biodegradable, Multifunctional DNAzyme Nanoflowers for Enhanced Cancer Therapy. *NPG Asia Mater.* **2017**, 9.
- (32) Bulcha, J. T.; Wang, Y.; Ma, H.; Tai, P. W. L.; Gao, G. Viral Vector Platforms within the Gene Therapy Landscape. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, 6 (1). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00487-6>.

- (33) OW Merten, B. G. Viral Vectors for Gene Therapy and Gene Modification Approaches. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *108*, 98–115.
- (34) Yin, H. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555.
- (35) Shrestha, H.; Bala, R.; Arora, S. Lipid-Based Drug Delivery Systems. *J Pharm (Cairo)* **2014**, *2014*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/801820>.
- (36) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84* (21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.21.7413>.
- (37) Oude Blenke, E. E.; Van Den Dikkenberg, J.; Van Kolck, B.; Kros, A.; Mastrobattista, E. Coiled Coil Interactions for the Targeting of Liposomes for Nucleic Acid Delivery. *Nanoscale* **2016**, *8* (16), 8955–8965. <https://doi.org/10.1039/C6NR00711B>.
- (38) O'Brien, P. J.; Elahipanah, S.; Rogozhnikov, D.; Yousaf, M. N. Bio-Orthogonal Mediated Nucleic Acid Transfection of Cells via Cell Surface Engineering. *ACS Cent Sci* **2017**, *3* (5), 489–500. https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.7B00132/ASSET/IMAGES/LARGE/OC-2017-00132S_0004.JPEG.
- (39) W Evers, M. J.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R.; Vader, P.; Schiffelers, R. M.; W Evers, M. J.; van der Meel, R.; Vader, P.; Schiffelers, R. M.; Kulkarni, J. A.; Cullis, P. R. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, *2* (9), 1700375. <https://doi.org/10.1002/SMTD.201700375>.
- (40) Viricel, W.; Poirier, S.; Mbarek, A.; Derbali, R. M.; Mayer, G.; Leblond, J. Cationic Switchable Lipids: PH-Triggered Molecular Switch for siRNA Delivery. *Nanoscale* **2016**, *9* (1), 31–36. <https://doi.org/10.1039/C6NR06701H>.
- (41) Lee, J.; Lee, H.; Goh, U.; Kim, J.; Jeong, M.; Lee, J.; Park, J. H. Cellular Engineering with Membrane Fusogenic Liposomes to Produce Functionalized Extracellular Vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8* (11), 6790–6795. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B01315/SUPPL_FILE/AM6B01315_SI_001.PDF.
- (42) Cui, Z. K.; Fan, J.; Kim, S.; Bezouglaia, O.; Fartash, A.; Wu, B. M.; Aghaloo, T.; Lee, M. Delivery of siRNA via Cationic Sterosomes to Enhance Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J Control Release* **2015**, *217*, 42–52. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2015.08.031>.
- (43) Xu, X.; Wu, J.; Liu, Y.; Yu, M.; Zhao, L.; Zhu, X.; Bhasin, S.; Li, Q.; Ha, E.; Shi, J.; Farokhzad, O. C. Ultra-PH-Responsive and Tumor-Penetrating Nanoplatform for

- Targeted siRNA Delivery with Robust Anti-Cancer Efficacy. *Angewandte Chemie* **2016**, *128* (25), 7207–7210. <https://doi.org/10.1002/ange.201601273>.
- (44) Liu, S.; Zhou, D.; Yang, J.; Zhou, H.; Chen, J.; Guo, T. Bioreducible Zinc(II)-Coordinative Polyethylenimine with Low Molecular Weight for Robust Gene Delivery of Primary and Stem Cells. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (14), 5102–5109. https://doi.org/10.1021/JACS.6B13337/SUPPL_FILE/JA6B13337_SI_001.PDF.
- (45) Li, L.; Song, L.; Liu, X.; Yang, X.; Li, X.; He, T.; Wang, N.; Yang, S.; Yu, C.; Yin, T.; Wen, Y.; He, Z.; Wei, X.; Su, W.; Wu, Q.; Yao, S.; Gong, C.; Wei, Y. Artificial Virus Delivers CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of Cells in Mice. *ACS Nano* **2017**, *11* (1), 95–111. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.6B04261/SUPPL_FILE/NN6B04261_SI_001.PDF.
- (46) Verma, D.; Gulati, N.; Kaul, S.; Mukherjee, S.; Nagaich, U. Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J Pharm (Cairo)* **2018**, *2018*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/9285854>.
- (47) Ludwig, C.; Wagner, R. Virus-like Particles-Universal Molecular Toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*. December 2007, pp 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>.
- (48) Pastuzyn, E. D.; Day, C. E.; Kearns, R. B.; Kyrke-Smith, M.; Taibi, A. V.; McCormick, J.; Yoder, N.; Belnap, D. M.; Erlendsson, S.; Morado, D. R.; Briggs, J. A. G.; Feschotte, C.; Shepherd, J. D. The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein That Mediates Intercellular RNA Transfer. *Cell* **2018**, *172* (1–2), 275–288.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.024>.
- (49) Chen, L.-S.; Wang, M.; Ou, W.-C.; Fung, C.-Y.; Chen, P.-L.; Chang, C.-F.; Huang, W.-S.; Wang, J.-Y.; Lin, P. Y.; Chang, D. Efficient Gene Transfer Using the Human JC Virus-like Particle That Inhibits Human Colon Adenocarcinoma Growth in a Nude Mouse Model. *Gene Ther* **2010**, *17* (8), 1033–1041. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.50>.
- (50) Eguchi, A.; Meade, B. R.; Chang, Y.-C.; Fredrickson, C. T.; Willert, K.; Puri, N.; Dowdy, S. F. Efficient siRNA Delivery into Primary Cells by a Peptide Transduction Domain–DsRNA Binding Domain Fusion Protein. *Nat Biotechnol* **2009**, *27* (6), 567–571. <https://doi.org/10.1038/nbt.1541>.
- (51) Sarett, S. M.; Werfel, T. A.; Lee, L.; Jackson, M. A.; Kilchrist, K. V.; Brantley-Sieders, D.; Duvall, C. L. Lipophilic siRNA Targets Albumin in Situ and Promotes Bioavailability, Tumor Penetration, and Carrier-Free Gene Silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (32), E6490–E6497. https://doi.org/10.1073/PNAS.1621240114/SUPPL_FILE/PNAS.1621240114.SAPP.PDF.

- (52) Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J. P.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes for Plasmid DNA Gene Delivery. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (39), 5242–5246. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200460437>.
- (53) Battigelli, A.; Wang, J. T. W.; Russier, J.; Da Ros, T.; Kostarelos, K.; Al-Jamal, K. T.; Prato, M.; Bianco, A. Ammonium and Guanidinium Dendron–Carbon Nanotubes by Amidation and Click Chemistry and Their Use for SiRNA Delivery. *Small* **2013**, *9* (21), 3610–3619. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201300264>.
- (54) Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H. Functionalization of Carbon Nanotubes via Cleavable Disulfide Bonds for Efficient Intracellular Delivery of SiRNA and Potent Gene Silencing. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (36), 12492–12493. https://doi.org/10.1021/JA053962K/SUPPL_FILE/JA053962KSI20050805_081936.PDF.
- (55) Maeda-Mamiya, R.; Noiri, E.; Isobe, H.; Nakanishi, W.; Okamoto, K.; Doi, K.; Sugaya, T.; Izumi, T.; Homma, T.; Nakamura, E. In Vivo Gene Delivery by Cationic Tetraamino Fullerene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (12), 5339–5344. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909223107/ASSET/30D5E1E2-9A10-4F23-9643-2EE45DA03CBA/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.0909223107EQ2.GIF>.
- (56) Chu, Z.; Miu, K.; Lung, P.; Zhang, S.; Zhao, S.; Chang, H. C.; Lin, G.; Li, Q. Rapid Endosomal Escape of Prickly Nanodiamonds: Implications for Gene Delivery. *Scientific Reports 2015 5:1* **2015**, *5* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep11661>.
- (57) Yi, Y.; Kim, H. J.; Mi, P.; Zheng, M.; Takemoto, H.; Toh, K.; Kim, B. S.; Hayashi, K.; Naito, M.; Matsumoto, Y.; Miyata, K.; Kataoka, K. Targeted Systemic Delivery of SiRNA to Cervical Cancer Model Using Cyclic RGD-Installed Unimer Polyion Complex-Assembled Gold Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2016**, *244*, 247–256. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.08.041>.
- (58) Conde, J.; Oliva, N.; Zhang, Y.; Artzi, N. Local Triple-Combination Therapy Results in Tumour Regression and Prevents Recurrence in a Colon Cancer Model. *Nature Materials 2016 15:10* **2016**, *15* (10), 1128–1138. <https://doi.org/10.1038/nmat4707>.
- (59) Zhang, X.; Zhu, L.; Zhang, H.; Chen, S.; Xiao, Y. CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Front Immunol* **2022**, *13*, 2876. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.927153/BIBTEX>.
- (60) Sterner, R. C.; Sterner, R. M. CAR-T Cell Therapy: Current Limitations and Potential Strategies. *Blood Cancer J* **2021**, *11* (4), 69. <https://doi.org/10.1038/S41408-021-00459-7>.
- (61) Zhang, C.; Liu, J.; Zhong, J. F.; Zhang, X. Engineering CAR-T Cells. *Biomark Res* **2017**, *5* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S40364-017-0102-Y/FIGURES/2>.

- (62) *Definition of CAR T-cell therapy - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI.*
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/car-t-cell-therapy> (accessed 2023-05-15).
- (63) Prasad, V. Tisagenlecleucel — the First Approved CAR-T-Cell Therapy: Implications for Payers and Policy Makers. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 15:1 **2017**, 15 (1), 11–12. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.156>.
- (64) O’Leary, M. C.; Lu, X.; Huang, Y.; Lin, X.; Mahmood, I.; Przepiora, D.; Gavin, D.; Lee, S.; Liu, K.; George, B.; Bryan, W.; Theoret, M. R.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: Tisagenlecleucel for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory b-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research* **2019**, 25 (4), 1142–1146. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2035/74058/AM/FDA-APPROVAL-SUMMARY-TISAGENLECLEUCEL-FOR>.
- (65) Locke, F. L.; Miklos, D. B.; Jacobson, C. A.; Perales, M.-A.; Kersten, M.-J.; Oluwole, O. O.; Ghobadi, A.; Rapoport, A. P.; McGuirk, J.; Pagel, J. M.; Muñoz, J.; Farooq, U.; van Meerten, T.; Reagan, P. M.; Sureda, A.; Flinn, I. W.; Vandenberghe, P.; Song, K. W.; Dickinson, M.; Minnema, M. C.; Riedell, P. A.; Leslie, L. A.; Chaganti, S.; Yang, Y.; Filosto, S.; Shah, J.; Schupp, M.; To, C.; Cheng, P.; Gordon, L. I.; Westin, J. R. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* **2022**, 386 (7), 640–654.
https://doi.org/10.1056/NEJMOA2116133/SUPPL_FILE/NEJMOA2116133_DATA-SHARING.PDF.
- (66) Bouchkouj, N.; Kasamon, Y. L.; Claro, R. A. de; George, B.; Lin, X.; Lee, S.; Blumenthal, G. M.; Bryan, W.; McKee, A. E.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research* **2019**, 25 (6), 1702–1708.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2743/74253/AM/FDA-APPROVAL-SUMMARY-AXICABTAGENE-CILOLEUCEL-FOR>.
- (67) Mian, A.; Hill, B. T. Brexucabtagene Autoleucel for the Treatment of Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1889510> **2021**, 21 (4), 435–441.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1889510>.
- (68) Iacoboni, G.; Rejeski, K.; Villacampa, G.; van Doesum, J. A.; Chiappella, A.; Bonifazi, F.; Lopez-Corral, L.; van Aalderen, M.; Kwon, M.; Martinez-Cibrian, N.; Bramanti, S.; Reguera-Ortega, J. L.; Camacho-Arteaga, L.; Schmidt, C.; Marin-Niebla, A.; Kersten, M. J.; Garcia-Sancho, A. M.; Zinzani, P. L.; Corradini, P.; van Meerten, T.; Subklewe, M.; Barba, P. Real-World Evidence of Brexucabtagene Autoleucel for the Treatment of Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma. *Blood Adv* **2022**, 6 (12), 3606–3610.
<https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2021006922>.

- (69) Iragavarapu, C.; Hildebrandt, G. Lisocabtagene Maraleucel for the Treatment of B-Cell Lymphoma. *https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1933939* **2021**, *21* (9), 1151–1156. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1933939>.
- (70) Abramson, J. S.; Palomba, M. L.; Gordon, L. I.; Lunning, M. A.; Wang, M.; Arnason, J.; Mehta, A.; Purev, E.; Maloney, D. G.; Andreadis, C.; Sehgal, A.; Solomon, S. R.; Ghosh, N.; Albertson, T. M.; Garcia, J.; Kostic, A.; Mallaney, M.; Ogasawara, K.; Newhall, K.; Kim, Y.; Li, D.; Siddiqi, T. Lisocabtagene Maraleucel for Patients with Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphomas (TRANSCEND NHL 001): A Multicentre Seamless Design Study. *The Lancet* **2020**, *396* (10254), 839–852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0).
- (71) Munshi, N. C.; Anderson, L. D.; Shah, N.; Madduri, D.; Berdeja, J.; Lonial, S.; Raje, N.; Lin, Y.; Siegel, D.; Oriol, A.; Moreau, P.; Yakoub-Agha, I.; Delforge, M.; Cavo, M.; Einsele, H.; Goldschmidt, H.; Weisel, K.; Rambaldi, A.; Reece, D.; Petrocca, F.; Massaro, M.; Connarn, J. N.; Kaiser, S.; Patel, P.; Huang, L.; Campbell, T. B.; Hege, K.; San-Miguel, J. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* **2021**, *384* (8), 705–716. https://doi.org/10.1056/NEJMOA2024850/SUPPL_FILE/NEJMOA2024850_DATA-SHARING.PDF.
- (72) Berdeja, J. G.; Madduri, D.; Usmani, S. Z.; Jakubowiak, A.; Agha, M.; Cohen, A. D.; Stewart, A. K.; Hari, P.; Htut, M.; Lesokhin, A.; Deol, A.; Munshi, N. C.; O'Donnell, E.; Avigan, D.; Singh, I.; Zudaire, E.; Yeh, T. M.; Allred, A. J.; Olyslager, Y.; Banerjee, A.; Jackson, C. C.; Goldberg, J. D.; Schecter, J. M.; Deraedt, W.; Zhuang, S. H.; Infante, J.; Geng, D.; Wu, X.; Carrasco-Alfonso, M. J.; Akram, M.; Hossain, F.; Rizvi, S.; Fan, F.; Lin, Y.; Martin, T.; Jagannath, S. Ciltacabtagene Autoleucel, a B-Cell Maturation Antigen-Directed Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (CARTITUDE-1): A Phase 1b/2 Open-Label Study. *The Lancet* **2021**, *398* (10297), 314–324. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00933-8).
- (73) Cohen, A. D.; Parekh, S.; Santomaso, B. D.; Pérez-Larraya, J. G.; van de Donk, N. W. C. J.; Arnulf, B.; Mateos, M. V.; Lendvai, N.; Jackson, C. C.; De Braganca, K. C.; Schecter, J. M.; Marquez, L.; Lee, E.; Cornax, I.; Zudaire, E.; Li, C.; Olyslager, Y.; Madduri, D.; Varsos, H.; Pacaud, L.; Akram, M.; Geng, D.; Jakubowiak, A.; Einsele, H.; Jagannath, S. Incidence and Management of CAR-T Neurotoxicity in Patients with Multiple Myeloma Treated with Ciltacabtagene Autoleucel in CARTITUDE Studies. *Blood Cancer Journal* **2022**, *12* (2), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00629-1>.
- (74) Chekol Abebe, E.; Yibeltal Shiferaw, M.; Tadele Admasu, F.; Asmamaw Dejenie, T. Ciltacabtagene Autoleucel: The Second Anti-BCMA CAR T-Cell Therapeutic Armamentarium of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Front Immunol* **2022**, *13*, 4987. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.991092/BIBTEX>.

- (75) Raes, L.; De Smedt, S. C.; Raemdonck, K.; Braeckmans, K. Non-Viral Transfection Technologies for next-Generation Therapeutic T Cell Engineering. *Biotechnol Adv* **2021**, *49*, 107760. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107760>.
- (76) Goldberg, M. S. Improving Cancer Immunotherapy through Nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **2019**, *19* (10), 587–602. <https://doi.org/10.1038/S41568-019-0186-9>.
- (77) Granot-Matok, Y.; Kon, E.; Dammes, N.; Mechtinger, G.; Peer, D. Therapeutic mRNA Delivery to Leukocytes. *Journal of Controlled Release* **2019**, *305*, 165–175. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2019.05.032>.
- (78) Billingsley, M. M.; Singh, N.; Ravikumar, P.; Zhang, R.; June, C. H.; Mitchell, M. J. Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. *Nano Lett* **2020**, *20* (3), 1578–1589. <https://doi.org/10.1021/ACS.NANOLETT.9B04246>.
- (79) Xie, Y.; Kim, N. H.; Nadiathe, V.; Schalk, D.; Thakur, A.; Kılıç, A.; Lum, L. G.; Bassett, D. J. P.; Merkel, O. M. Targeted Delivery of siRNA to Activated T Cells via Transferrin-Polyethylenimine (Tf-PEI) as a Potential Therapy of Asthma. *Journal of Controlled Release* **2016**, *229*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.03.029>.
- (80) Hajj, K. A.; Whitehead, K. A. Tools for Translation: Non-Viral Materials for Therapeutic mRNA Delivery. *Nat Rev Mater* **2017**, *2*. <https://doi.org/10.1038/NATREVMATS.2017.56>.