

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Uso de Nanomedicina en el desarrollo de terapias celulares.

Use of Nanomedicine in the development of cell therapies.

Autora: Paola Eguiluz De Celis

Directores:

Mónica López Fanarraga

María de Arcocha Torres

Santander, Junio de 2025

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract	4
1. Introducción. Impacto de la nanotecnología en la medicina	5
2. Objetivos	6
3. ¿Qué es la nanomedicina y cuál es su potencial en la inmunoterapia?	6
4. Terapias celulares	7
4.1- Historia	7
4.2 - Nanotecnología en terapias con células madre	8
5. Nanomedicina aplicada a las terapias CAR-T	9
5.1. Historia y evolución de la terapia CART- T	9
5.2. Proceso de creación de células CAR-T	10
5.3. Estructura y funcionalidad del receptor CAR	11
5.4. Limitaciones CAR-T	12
6. ¿Cómo mejora la nanomedicina las limitaciones de la terapia CAR-T?	14
6.1. Generación de CAR en células T empleando nanopartículas	14
6.2. Contribución de la nanotecnología	15
6.3. Resumen de los resultados comparados de nanopartículas frente a vectores virales en la terapia CAR-T	16
7. Materiales y Métodos	17
8. Resultados y Discusión	18
9. Conclusiones	18
Bibliografía	19
Agradecimientos	23

ABREVIATURAS

NP	Nanoparticles / Nanopartículas
CART	Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy / Receptor de antígeno quimérico de célula T
FDA	Food and Drug administration / Administración de alimentos y medicamentos.
MRI	Magnetic Resonance Imaging / Imagen de resonancia magnética
NK	Natural Killer / Células asesinas naturales
LAK	Lymphokine activated killer cells / Linfocitos citolíticos activados por linfocinas
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes / Linfocitos infiltrantes del tumor
DC	Dendritic cells / Células dendríticas
TCR-T	T Cell Receptor-engineered T cells / Célula T con receptor de célula T
SPIONs	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles / Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
PET	Positron Emission Tomography / Tomografía por emisión de positrones
DNA	Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico
RNAm	Messenger RNA / ARN mensajero
SgRNA	Single guide RNA / Guía del ARN
TRAC	T Cell Receptor Alpha Constant
VH	Variable region of the Heavy chain / Región variable de la cadena pesada
VL	Variable region of the Light chain / Región variable de la cadena ligera
ScFv	Single-chain variable fragment / Fragmento variable de cadena sencilla
MHC	Major Histocompatibility Complex / Complejo mayor de histocompatibilidad
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia / Leucemia linfoblástica aguda
IFN-γ	Interferon gamma / Interferón gamma
MDSCs	Myeloid Derived Suppressor Cells / Células mieloides supresoras
TAMs	Tumor Associated Macrophages / Macrófagos asociados al tumor
TREGs	Regulatory T Cells / Células T reguladoras
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas
Cas9	CRISPR Associated Protein 9 / Proteína asociada a CRISPR 9
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 / Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 / Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
PEG-PC	Polyethylene Glycol–Phosphatidylcholine/ Polietilenglicol-fosfatidilcolina
PEI-CHO	Polyethylenimine–Aldehyde / Polietilenimina-aldehído
PEG	Polyethylene Glycol / Polietilenglicol
LNPs	Lipid Nanoparticles / Nanopartículas lipídicas

RESUMEN

Este trabajo aborda el uso de la nanomedicina en el desarrollo de terapias celulares, con especial énfasis en las células CAR-T. Las terapias convencionales, como la modificación genética de linfocitos T, han mostrado eficacia en el tratamiento de cáncer, pero dependen de vectores virales, lo que conlleva riesgos de mutagénesis y altos costos. La nanomedicina, mediante el uso de nanopartículas, ofrece una alternativa no viral para la transducción génica, permitiendo la expresión de receptores CARs en linfocitos T con menor riesgo de efectos secundarios y mejorando la reproducibilidad del proceso. Además, la tecnología CRISPR/Cas9 ha revolucionado la modificación genética al permitir ediciones precisas en el genoma, optimizando las terapias CAR-T y acelerando su evolución desde sus primeros enfoques en los años 90. Este avance no solo mejora la seguridad y eficiencia de las terapias, sino que también abre nuevas posibilidades para tratar el cáncer y otras enfermedades. La integración de la nanomedicina y la herramienta CRISPR/Cas9 representa un paso importante hacia una medicina personalizada y más accesible.

Palabras clave: Nanomedicina, terapias celulares, CAR-T, vectores virales, CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

This review addresses the use of nanomedicine in the development of cell therapies, with a particular emphasis on CAR-T cells. Conventional therapies, such as the genetic modification of T lymphocytes, have shown efficacy in cancer treatment but rely on viral vectors, which carry risks of mutagenesis and high costs. Nanomedicine, through nanoparticles, offers a non-viral alternative for gene transduction, enabling the expression of CAR receptors in T lymphocytes with a lower risk of side effects and improving the reproducibility of the process. Additionally, CRISPR/Cas9 technology has revolutionized genetic modification by allowing precise genome editing, optimizing CAR-T therapies and accelerating their evolution since their early approaches in the 1990s. This advancement not only improves the safety and efficiency of therapies but also opens new possibilities for treating cancer and other diseases. The integration of nanomedicine and the CRISPR/Cas9 tool represents an important step toward personalized and more accessible medicine.

Keywords: Nanomedicine, cell therapies, CAR-T, viral vectors, CRISPR/Cas9.

1. Introducción. Impacto de la nanotecnología en la medicina

La nanotecnología ha transformado significativamente el ámbito de la medicina al proporcionar soluciones innovadoras para el diagnóstico, monitorización, tratamiento y prevención de diversas enfermedades. La incorporación de nanomateriales en este campo ha impulsado avances sustanciales en la administración dirigida de fármacos, la medicina regenerativa y las terapias celulares.¹

En el ámbito de la farmacología, el empleo de nanomateriales como liposomas, nanopartículas poliméricas o metálicas ha mejorado la biodisponibilidad y toxicidad sistémica de los fármacos.² Estos avances han sido particularmente relevantes en el tratamiento del cáncer, donde los nanosistemas diseñados para la terapia oncológica permiten la administración controlada y dirigida de los agentes terapéuticos. Esto es posible gracias a la funcionalización de los nanotransportadores con biomoléculas específicas, lo que facilita su internalización en las células diana y optimiza la eficacia terapéutica.³

En el campo de la medicina regenerativa, la nanotecnología ha supuesto un progreso significativo en la ingeniería de tejidos, cuyo objetivo principal es la reconstrucción de estructuras dañadas mediante la creación de tejidos autólogos *in vitro*. Este proceso requiere la combinación de tres elementos esenciales: biomoléculas activas, células específicas y andamios biocompatibles. No obstante, uno de los principales desafíos de las técnicas convencionales radica en la replicación precisa del microambiente tisular.⁴ En este contexto, los nanomateriales mejoran las propiedades de los andamios, mejorando su biocompatibilidad, conductividad eléctrica y capacidad de inducir la diferenciación celular. Así, los andamios nanoestructurados imitan la matriz extracelular, favoreciendo la adhesión y proliferación celular y optimizando la regeneración tisular.⁵

Por otro lado, la nanotecnología desempeña un papel fundamental en el desarrollo de terapias celulares. La utilización de sistemas de encapsulación basados en nanomateriales ha permitido la manipulación de células con el propósito de potenciar su eficacia terapéutica.⁶ En la actualidad, diversas nanopartículas (NP) han sido aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su aplicación en el rastreo celular mediante técnicas de imagen, como la resonancia magnética (MRI). Un ejemplo destacado son las nanopartículas de óxido de hierro, como Feridex y Resovist, utilizadas principalmente para el rastreo hepático. Esta estrategia representa una herramienta fundamental para evaluar la seguridad y eficacia de las terapias celulares, consolidando el papel de la nanotecnología como un pilar en la evolución de la medicina moderna.^{7,8}

Por último, la nanotecnología ha impulsado el desarrollo y ha mejorado la eficacia de la ingeniería de células T con receptores CAR-T. Este enfoque representa una herramienta clave en el desarrollo de terapias personalizadas.⁹ A lo largo de este trabajo, se explorarán profundamente sus fundamentos, aplicaciones y potencial en la medicina de precisión.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar el impacto de la nanomedicina en el desarrollo de terapias celulares, con especial énfasis en su contribución a la mejora de la ingeniería de células CAR-T, comparando su eficacia y seguridad frente a las estrategias tradicionales basadas en vectores virales.

Esta revisión se propone caracterizar los principales nanomateriales utilizados en terapias celulares, analizar las limitaciones de los vectores virales en la generación de células CAR-T y explorar cómo la nanotecnología puede mejorar o sustituir estos métodos mediante una entrega más segura y eficiente de material genético. Además, se busca comparar estudios relevantes que integran nanotecnología en la ingeniería de CAR-T y evaluar su aplicabilidad clínica, considerando tanto su potencial terapéutico como sus desafíos.

3. ¿Qué es la nanomedicina y cuál es su potencial en la inmunoterapia?

La inmunoterapia se fundamenta en la activación del sistema inmunológico del paciente para que ataque las células tumorales. Entre las terapias más innovadoras, se incluyen las terapias celulares como la terapia con células T modificadas con receptores de antígeno quimérico (CAR-T) y las células NK (*natural killer*), que implican la modificación ex vivo de células inmunitarias para mejorar su capacidad de reconocer y destruir células malignas.¹⁰ A pesar de los avances en este campo, la tasa de respuesta de los pacientes sigue siendo relativamente baja. En particular, la nanomedicina ha demostrado un notable potencial para revolucionar la inmunoterapia, un enfoque cada vez más destacado en la lucha contra el cáncer.

La nanomedicina es una disciplina emergente dentro de las ciencias biomédicas que aplica los principios de la nanotecnología al ámbito de la salud, con el objetivo de diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades a nivel molecular y celular. Esta rama se basa en la manipulación de materiales y estructuras en escalas nanométricas (generalmente entre 1 y 100 nanómetros), lo que permite interactuar con los sistemas biológicos de manera precisa, dado que estas dimensiones son comparables al tamaño de las biomoléculas en el cuerpo humano.^{11,12}

Entre otras, la nanomedicina puede potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral a través de múltiples funciones inmunoestimuladoras. Estas funciones pueden activarse tanto por inyección directa en el tumor como por acumulación selectiva en el tejido tumoral tras su administración intravenosa. Así, las nanomedicinas dirigidas específicamente al tumor tienen la capacidad de fortalecer la inmunidad antitumoral mediante diversos mecanismos, entre ellos: la inducción de muerte celular inmunogénica, la modificación del microambiente inmunológico tumoral mediante la liberación controlada de inmunomoduladores, y la eliminación o reprogramación de células inmunosupresoras.¹³ Asimismo, la nanomedicina puede mejorar la presentación

de antígenos tumorales a las células presentadoras de antígenos, activar vías de la inmunidad innata y favorecer la infiltración de células inmunocompetentes en el tumor, facilitando así su interacción directa con las células cancerosas.¹⁴

4. Terapias celulares

4.1 Historia

Las terapias celulares han evolucionado significativamente con los avances científicos y tecnológicos. En 1956, los trasplantes hematopoyéticos se introdujeron como tratamiento para enfermedades hematológicas. Este enfoque, que consistía en trasplantar células madre hematopoyéticas de un donante a un paciente, abrió nuevas posibilidades terapéuticas para leucemias y linfomas, marcando el inicio de las terapias celulares y sentando las bases para los avances en medicina regenerativa y oncológica.^{15,16}

En los años 80, la investigación en terapias celulares dio un salto significativo con el desarrollo de las células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). Las células LAK, una forma de células NK generadas ex vivo, fueron de las primeras en utilizarse en inmunoterapia adoptiva, un enfoque que revolucionaría la forma de tratar el cáncer. Por otro lado, las células TIL, extraídas directamente de los tumores de los pacientes, demostraron su capacidad para reconocer y atacar células tumorales específicas, lo que las convirtió en una de las primeras estrategias exitosas para modificar el sistema inmunológico en beneficio de los pacientes con cáncer.^{17,18}

En la década de 1990, los avances científicos permitieron identificar antígenos tumorales reconocidos por las células TIL, lo que facilitó el desarrollo de terapias como las vacunas basadas en antígenos tumorales y células dendríticas (DC). Estas terapias utilizaron el sistema inmune del paciente para destruir células cancerosas de manera más precisa, mejorando la eficacia del tratamiento.¹⁸

A principios de los 2000, las terapias CAR-T y TCR-T (células T con receptor de células T) revolucionaron la terapia celular al modificar genéticamente las células T para destruir células tumorales específicas. Estas terapias trataron tumores resistentes a enfoques convencionales, representando un avance disruptivo en el tratamiento del cáncer, especialmente en enfermedades hematológicas.¹⁹

A partir del 2010 se consolidaron las terapias CAR-T. Estas terapias demostraron una eficacia notable en el tratamiento de leucemias y linfomas, logrando una tasa de respuesta que no se había alcanzado con terapias anteriores. La aprobación por parte de la FDA de las primeras terapias CAR-T, como tisagenlecleucel (Kymriah) y axicabtagene ciloleucel (Yescarta), marcó un hito en la medicina, brindando nuevas esperanzas a los pacientes con cáncer y abriendo la puerta a nuevas oportunidades de tratamiento.^{19,20}

4.2 Nanotecnología en terapias con células madre

En este trabajo, si bien el enfoque principal estará en las CAR-T dado que representa la terapia celular más utilizada en la actualidad, es importante destacar que no es la única opción terapéutica que podría verse beneficiada de mejoras mediante la nanomedicina. Existen otras terapias celulares en las que la nanomedicina ha desempeñado, o podría desempeñar un papel fundamental en su desarrollo y optimización.⁵

La integración de la nanotecnología en la terapia celular ha permitido superar muchas de las limitaciones asociadas a los tratamientos convencionales. Estas son las aplicaciones más destacadas:²¹

- **Mejora de la entrega de fármacos y genes:**

Una de las estrategias más prometedoras de la nanomedicina en la terapia celular es la mejora en la administración de fármacos y material genético. Las nanopartículas pueden ser diseñadas para transportar estos agentes y de manera dirigida, aumentar su concentración en el sitio de acción, evitando la eliminación y degradación prematura del compuesto en el organismo. Este enfoque resulta especialmente relevante en el tratamiento del cáncer y en la terapia con células madre, donde la administración localizada de fármacos puede optimizar los resultados terapéuticos.²²

Además, nanopartículas como las de óxido de hierro superparamagnético (SPIONs) han demostrado ser eficaces en el direccionamiento de células madre hacia sitios específicos del organismo, facilitando su migración y asegurando su permanencia en el tejido diana. A su vez, estas NP también pueden ser empleadas como sistema de transporte de fármacos y funcionalizadas con moléculas específicas consiguiendo la liberación controlada de fármacos o material genético directamente en las células diana, mejorando la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos adversos sistémicos.^{8,22}

- **Modulación del microambiente tumoral:**

El microambiente tumoral juega un papel crucial en la progresión del cáncer y en la resistencia a los tratamientos. Muchas terapias enfrentan dificultades para ser efectivas debido a la presencia de un entorno altamente inmunosupresor, caracterizado por la acumulación de células mieloides supresoras, macrófagos asociados al tumor y linfocitos T reguladores.

En este contexto, las nanopartículas han surgido como una herramienta clave para reprogramar el microambiente tumoral y hacerlo más propicio para la acción del sistema inmunológico. Se han desarrollado NP capaces de transportar inhibidores de puntos de control inmunitarios, citoquinas o agentes epigenéticos, con el fin de revertir la inmunosupresión y promover la infiltración de células T citotóxicas en el tumor. De este modo, se mejora la respuesta inmunitaria del paciente y se potencia la eficacia de las terapias celulares adoptivas, como las CAR-T y las células NK modificadas.²³

- **Seguimiento y monitoreo de células terapéuticas:**

Otro aspecto fundamental de mejora en la terapia celular es el poder rastrear y monitorear el comportamiento de las células terapéuticas una vez han sido administradas en el organismo. El seguimiento de células madre o inmunitarias modificadas es crucial para evaluar su biodistribución, migración y persistencia en el tejido objetivo. Para ello, se han diseñado nanopartículas con propiedades radiactivas, ópticas y magnéticas que permiten la localización y visualización en tiempo real de estas células mediante técnicas avanzadas de imagen, como la resonancia magnética (MRI) o la tomografía por emisión de positrones (PET).²⁴ Además, el uso de NP con capacidad de respuesta a estímulos específicos, como el pH o la temperatura, permite generar sistemas de liberación de fármacos altamente controlados.^{25,26}

- **Ingeniería y regeneración tisular:**

En medicina regenerativa, la ciencia de biomateriales y la nanotecnología se utilizan para crear andamios tridimensionales que favorecen la proliferación y diferenciación de células madre, ayudando a reparar tejidos dañados. Los polímeros enriquecidos con NP ofrecen ventajas sobre los tradicionales, como mayor durabilidad y una interfaz bioactiva, fundamentales para el éxito de las prótesis.⁵

Esta tecnología ha mostrado eficacia en la regeneración de tejidos óseos, cartilaginosos, cardíacos y neuronales. En el ámbito cardiovascular, se utilizan andamios de carbono y nanofibras poliméricas. En regeneración cutánea, las nanofibras de colágeno y los hidrogeles han mostrado gran potencial. En neurociencia, NP gelatinosas con propiedades antibacterianas permiten la formación de andamiajes neuronales, facilitando la regeneración del tejido nervioso.²⁷⁻²⁹

5. Nanomedicina aplicada a las terapias CAR-T

Las células CAR-T representan una innovadora estrategia de inmunoterapia basada en la modificación genética de los linfocitos T, otorgándoles la capacidad de expresar un receptor quimérico de antígeno (CAR) diseñado específicamente para reconocer un antígeno tumoral. Estas terapias han transformado el tratamiento del cáncer al combinar la especificidad de los anticuerpos con la capacidad citotóxica de las células T.³⁰

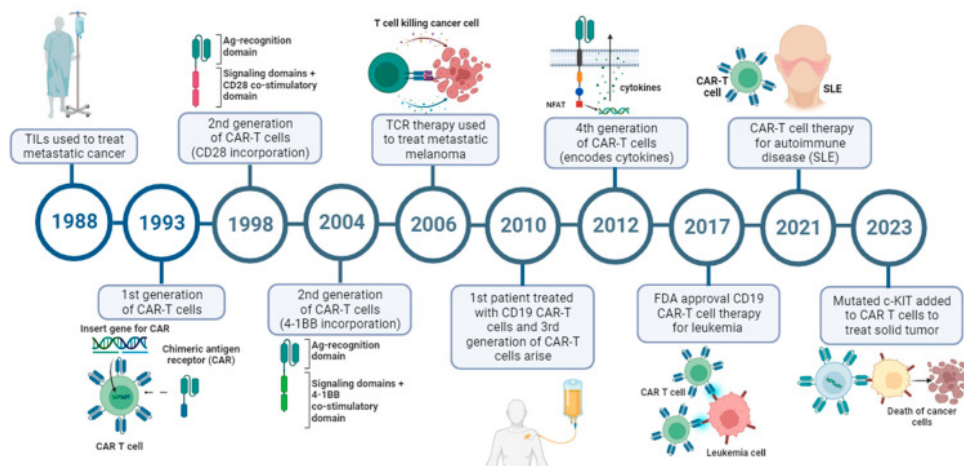
5.1 Historia y evolución de la terapia CART- T

Desde su concepción, esta estrategia ha evolucionado a lo largo de distintas generaciones, mejorando su eficacia y aplicabilidad en diversas patologías.³⁰

Los primeros desarrollos de CAR-T presentaban limitaciones debido a la falta de señales coestimuladoras, lo que afectaba la expansión y persistencia de las células modificadas. Posteriormente, la incorporación de dominios coestimuladores permitió superar estos obstáculos, optimizando la respuesta terapéutica. Con el tiempo, se han desarrollado versiones más avanzadas que

incluyen múltiples señales coestimuladoras e incluso la capacidad de liberar citoquinas para potenciar la actividad antitumoral.^{31,32}

Un punto clave en la historia de esta terapia fue la aprobación de los primeros tratamientos para neoplasias hematológicas refractarias, lo que marcó el inicio de su aplicación clínica a gran escala. Desde entonces, las terapias CAR-T han seguido expandiéndose hacia nuevas indicaciones, incluidas enfermedades autoinmunes y tumores sólidos.³¹



Los hitos clave desde el primer tratamiento con linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) para el cáncer metastásico hasta la aplicación más reciente de la terapia con células CAR-T.

Figura 1: Línea del tiempo del desarrollo histórico de la terapia con CAR-T. Imagen obtenida de Uscanga-Palomeque et al. In J Molec Sci, (2023)24, Ref³³

5.2 Proceso de creación de células CAR-T

El proceso de fabricación de las células CAR-T dura unas cuatro -cinco semanas e implica una serie de etapas clave que garantizan la funcionalidad y eficacia terapéutica de estas células modificadas.³⁴

- 1- Aislamiento y activación de células T:** El primer paso en la generación de células CAR-T consiste en la obtención de linfocitos T a partir de la sangre periférica del paciente mediante un procedimiento de **leucaféresis**. Una vez aisladas, estas células se activan in vitro utilizando anticuerpos dirigidos contra los correceptores CD3 y CD28, lo que imita la señalización fisiológica mediada por las células presentadoras de antígenos. Esta activación es fundamental para preparar las células T para su posterior modificación genética.³⁵
- 2- Edición genética de las células T:** Como reto futuro, la modificación genética de los linfocitos T podría realizarse mediante diversas técnicas, siendo la tecnología CRISPR/Cas9 una de las más avanzadas. Este sistema emplea la nucleasa Cas9 y un RNA guía (sgRNA) que dirige la edición hacia un sitio específico del genoma, permitiendo modificaciones precisas. Esta técnica mejoró la integración de CD-19 en el locus TRAC para una mayor eficacia clínica, aumentando la diferenciación de las

células CAR-T y reduciendo la señalización iónica y la debilidad del CAR en el microambiente tumoral.^{36,37}

- 3- Transducción con vectores virales:** Para conferir a las células T la capacidad de expresar el receptor quimérico de antígeno, se emplean vectores virales, principalmente lentivirus, que introducen el gen CAR en el genoma de las células T. Estos vectores víricos se producen en células empaquetadoras, como las células 293T que han sido tranfectadas con varios plásmidos que codifican los elementos esenciales del vector viral, incluyendo el transgén CAR, las proteínas de envoltura y las proteínas de empaquetamiento. Estas células serán las que produzcan los virus recombinantes que luego se emplearán en la transducción de las células T. Una vez infectadas por los virus recombinantes y transducidas, las células T comienzan a expresar el receptor quimérico en su superficie.^{34,35}
- 4- Expansión y selección de células modificadas:** Posterior a la transducción, las células CAR-T son cultivadas en condiciones controladas para favorecer su proliferación, expandirlas y alcanzar la cantidad necesaria para su administración terapéutica. En esta fase de expansión se optimiza las condiciones para que se produzca el crecimiento de las células T, con el soporte de citocinas como IL-2, IL-7 y/o IL-15.³⁸
- 5- Infusión en el paciente:** Una vez alcanzado el número adecuado de células CAR-T funcionales, estas son reinfundidas en el paciente. Al ingresar en el organismo, reconocen y eliminan las células tumorales que expresan el antígeno diana.³⁹

5.3 Estructura y funcionalidad del receptor CAR

El receptor quimérico de antígeno está compuesto por cuatro dominios principales:⁴⁰

- 1- Dominio de reconocimiento de antígeno:** Es encargado de conferir especificidad hacia un antígeno diana. Se obtienen de las regiones variables pesada (VH) y ligera (VL) de anticuerpos monoclonales, unidas por un enlace flexible para formar un fragmento variable de cadena única (scFv).⁴⁰

Su función permite el reconocimiento selectivo del antígeno tumoral de manera independiente de la presentación por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La afinidad del dominio de unión al antígeno es fundamental, ya que determina el reconocimiento de los antígenos en las células tumorales, la inducción de la señalización del CAR y la activación de los linfocitos T.³⁴

- 2- Región bisagra:** Esta región junto con el dominio de reconocimiento de antígeno, forma el dominio extracelular. Proporciona flexibilidad, facilitando el acceso al epítipo diana. Su longitud y composición impactan

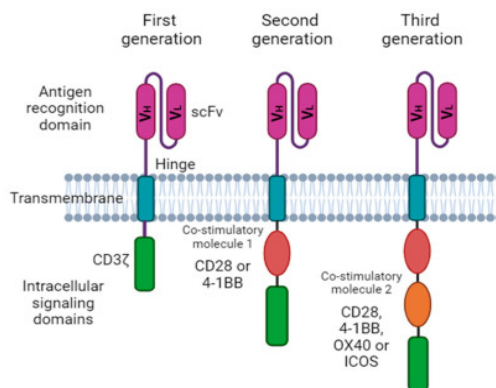
en la expresión, señalización y activación celular del CAR. ^{40,41} Las bisagras más utilizadas provienen de CD8, CD28, IgG1 o IgG4. ⁴²

3- Dominio transmembrana: Conecta el scFv con los dominios intracelulares, proporcionando estabilidad estructural y afectando la expresión, señalización y formación de la sinapsis inmunológica del CAR. ⁴⁰

Los dominios más comunes provienen de CD3 ζ , CD4, CD8 α y CD28, aunque su función específica no está completamente clara. El dominio transmembrana de CD3 ζ puede potenciar la activación celular, pero reduce la estabilidad del CAR en comparación con CD28. ⁴³

La combinación del dominio transmembrana con la región bisagra modula la producción de citocinas y la muerte celular inducida por activación. Se sugiere que una señalización eficiente se logra con la selección adecuada del dominio transmembrana y la región intracelular, mientras que CD8 α o CD28 optimizan la estabilidad y expresión del CAR. ⁴⁴

4- Dominios de señalización intracelular: Los CARs de primera generación, que usaban el dominio CD3 ζ , presentaban limitaciones en cuanto a durabilidad y eficacia. La adición de señales coestimuladoras, como CD28 o 4-1BB, demostró mejorar la proliferación y producción de IL-2 en modelos de neoplasias de células B, lo que llevó al desarrollo de CARs de segunda generación. Estos CARs mejoraron la activación y persistencia de las células CAR-T. ³⁶ Se crearon CARs de tercera generación con dos dominios coestimuladores en serie, que demostraron mejores respuestas en algunos modelos tumorales, pero no superaron a los de segunda generación en otros. Aunque los CARs con diferentes dominios coestimuladores presentan potencial, su evaluación en ensayos clínicos aún continúa. ^{43,45}



mejores respuestas en algunos modelos tumorales, pero no superaron a los de segunda generación en otros. Aunque los CARs con diferentes dominios coestimuladores presentan potencial, su evaluación en ensayos clínicos aún continúa. ^{43,45}

Figura 2. Estructura y generación de células CAR-T. Imagen obtenida de *Uscanga-Palomeque et al. In J Molec Sci, (2023)24, Ref* ³³

5.4 Limitaciones CAR-T

Aunque varias terapias CAR-T aprobadas han demostrado resultados, los métodos in vitro para producir grandes cantidades de células CAR-T son demasiado complejos para su aplicación a gran escala en el tratamiento de pacientes. Debido a la necesidad de equipos especializados y una gran experiencia técnica, la terapia CAR-T solo está disponible en unos pocos centros a nivel mundial. La complejidad de los procedimientos y los altos costos asociados con la producción de células CAR-T representan importantes

obstáculos para su implementación como tratamiento estándar. ⁴⁶ Estas son sus principales limitaciones:

- **Escape antigénico:** Se produce debido a la capacidad de las células cancerosas de modificar sus antígenos y volverse resistentes a los CAR dirigidos contra ellos. ²⁵ El escape antigénico es un desafío en la terapia con células CAR-T, ya que algunos tumores desarrollan resistencia. Por ejemplo, en leucemia linfoblástica aguda (ALL), hasta el 70% de los pacientes recaídos tras CAR-T dirigida a CD19 presentan pérdida de este antígeno. ⁴⁰
- **Toxicidad:** Además del daño en tejidos normales que expresan el mismo antígeno que el tumor, existen dos síndromes principales asociados a la toxicidad de las células CAR-T:
 - **Síndrome de liberación de citocinas (CRS):** Se produce por la liberación masiva de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-10 e IFN- γ . Sus síntomas varían desde fiebre y disnea hasta hipotensión y fallo orgánico. ^{25,47}
 - **Neurotoxicidad:** Puede manifestarse como encefalopatía, convulsiones, obnubilación e incluso muerte. Aunque su fisiopatología no está completamente entendida, se relaciona con el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo la entrada de citoquinas inflamatorias como IFN- γ . ^{40,47}

El tratamiento de estas toxicidades se basa en cuidados paliativos, tocilizumab (bloqueador del receptor de IL-6) y esteroides. ⁴⁷
- **Naturaleza supresora del microambiente tumoral:** En el microambiente tumoral, diversas células inmunosupresoras pueden infiltrarse en tumores sólidos, incluyendo células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), macrófagos asociados al tumor (TAMs) y células T reguladoras (Tregs). Estas células, junto con las tumorales, favorecen la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que facilitan la progresión del tumor. Además, las vías de puntos de control inmunológico, como PD-1 y CTLA-4, pueden reducir la inmunidad antitumoral. ⁴⁰

Uno de los principales motivos de una respuesta débil o nula a la terapia con CAR-T es la expansión deficiente y la baja persistencia de las células T, lo que se ha asociado con el agotamiento celular inducido por vías co-inhibitorias. Por ello, la combinación de células CAR-T y bloqueo de puntos de control inmunológico se considera una estrategia clave en la inmunoterapia. ^{40,45}

6. ¿Cómo mejora la nanomedicina las limitaciones de la terapia CAR- T?

Los métodos que utilizan vectores virales han demostrado ser herramientas eficaces y confiables en la terapia génica, ya que permiten una expresión prolongada del transgén en linfocitos T. Actualmente, se han empleado con éxito distintos tipos de vectores virales, lentivirus y retrovirus gamma principalmente, para insertar receptores quiméricos de antígeno en linfocitos T de pacientes.⁴⁸

No obstante, su aplicación clínica se ve limitada por varios factores. Entre ellos destacan el alto costo y el largo tiempo requerido para su producción, así como ciertos riesgos de seguridad, como la mutagénesis insercional, la posibilidad de generar virus infecciosos, el silenciamiento transcripcional del transgén y la expansión clonal no controlada. Además, la integración estable del material genético en el DNA del paciente requiere sistemas complejos, lo cual puede comprometer la eficacia del tratamiento y generar toxicidad sistémica, crecimiento celular anormal e incluso oncogénesis. Ante estas limitaciones, se han explorado métodos alternativos de transfección más seguros y eficientes.⁴⁹

En este contexto, como alternativa a los vectores virales, se han desarrollado métodos no virales como la electroporación de ARNm, que permite una expresión génica rápida y transitoria, aunque con limitaciones en la duración y cierta toxicidad celular. Para lograr una expresión más estable, se están investigando nanopartículas biodegradables, como las de poli(β -amino éster) diseñadas para dirigir ADN específicamente a linfocitos T mediante anticuerpos y facilitar su transporte activo al núcleo celular. Otras opciones incluyen nanopartículas lipídicas y sistemas basados en péptidos y polímeros catiónicos, que ofrecen ventajas en protección y entrega del material genético, aunque presentan desafíos en estabilidad, escalabilidad, inmunogenicidad y costos de producción.⁵⁰

6.1 Generación de CAR en células T, empleando nanopartículas

Receptores CAR basados en nanobodies: A diferencia de los CAR convencionales, que incorporan fragmentos de anticuerpos de cadena ligera y pesada (scFv) y pueden desencadenar respuestas inmunológicas adversas, los *nanobodies* son dominios variables de anticuerpos de cadena pesada (VHH) que se unen de forma específica a diversos antígenos tumorales, como VEGFR2 o HER2, presentando una inmunogenicidad significativamente menor.²⁵

La aplicación de la tecnología CRISPR-Cas9 ha permitido la inserción precisa de genes que codifican estos *nanobodies* en sitios específicos del genoma de las células T, facilitando la generación de CAR-T con mayor seguridad, especificidad y un perfil inmunológico mejorado.⁵¹

Sistema PiggyBac: Es una alternativa eficiente y no viral para la generación de células CAR-T. Utiliza un transposón y una transposasa para insertar el gen CAR en el genoma de linfocitos T, comúnmente mediante electroporación. A diferencia de los vectores virales, permite una mayor capacidad de inserción con un menor coste y riesgo de mutagénesis insercional.⁵² Esta tecnología necesita

de nanopartículas para poder encapsular y dirigir el fragmento de DNA necesario para la transducción controlada.

Estudios recientes han demostrado que CAR-T generadas con *PiggyBac* muestran eficacia en leucemias y linfomas, manteniendo una expresión estable del CAR y un perfil funcional comparable al de terapias virales.⁵³ Además, puede combinarse con otras nanopartículas de entrega del CRISPR/Cas9 para realizar ediciones precisas, ampliando su aplicación en terapias personalizadas. Su flexibilidad y seguridad lo convierten en una plataforma prometedora para escalar la producción de CAR-T a menor coste y con mayor control genético.^{52,54}

Células TRAC: La estrategia de integración dirigida del transgén en el locus TRAC (cadena constante alfa del receptor de células T) representa un avance en la ingeniería de células CAR-T. Este enfoque posibilita una regulación controlada de la expresión del CAR, lo que resulta en una funcionalidad superior y en la reducción del agotamiento de los linfocitos T tanto in vitro como in vivo.

Mediante el uso de CRISPR-Cas9, se ha demostrado que la inserción específica de un CAR contra CD19 en el locus TRAC, usando vectores adenoasociados, mejora notablemente el rendimiento funcional de las células CAR-T frente a las obtenidas por métodos de transducción retroviral convencional.^{55,56}

Además, la utilización de nanopartículas biodegradables especialmente diseñadas para la entrega eficiente y dirigida del ADN ha cobrado relevancia. Estas NPs facilitan la transfección específica de células T y promueven el transporte activo del material genético hacia el núcleo, lo que mejora la eficiencia y seguridad del proceso de edición génica para la generación de células TRAC.⁵⁷ Esta estrategia presenta ventajas adicionales:

- **Regulación transcripcional mejorada y reducción del agotamiento celular:** La integración precisa en un sitio transcripcionalmente activo garantiza una expresión óptima del CAR.
- **Eliminación del receptor T nativo (TCR/CD3):** Al suprimir la expresión del TCR, se minimiza el riesgo de enfermedad injerto contra huésped en terapias alogénicas, lo que allana el camino para el desarrollo de productos CAR-T universales.
- **Reducción de la mutagénesis insercional:** La inserción dirigida evita la expresión no deseada del CAR en células leucémicas residuales.⁵⁵

6.2 Contribución de la nanotecnología

Aunque aún no es el método predominante, la nanotecnología puede intervenir en diversas fases de la generación de células CAR-T. El objetivo perseguido es integrar el DNA en el núcleo, programando directamente las células T in vivo, simplificando el proceso y evitando pasos ex vivo complejos. Su diseño versátil

facilita la orientación a múltiples receptores celulares, ampliando su aplicabilidad en tumores heterogéneos y otras enfermedades genéticas. Las ventajas son:

- **Transporte de CRISPR-Cas9 y DNA donador:**
Se están desarrollando nanopartículas lipídicas, poliméricas o híbridas capaces de empaquetar y transportar de forma eficiente el complejo Cas9 junto a la guía de RNA y la plantilla de DNA, dirigiéndolos directamente al núcleo celular. Esta estrategia podría sustituir la electroporación, reduciendo así la toxicidad y protegiendo el material genético de la degradación.^{58,59}
- **Reducción de la activación inmune:**
Las nanopartículas diseñadas con criterios específicos pueden evitar la activación de los sensores intracelulares de DNA, lo que disminuye la apoptosis posterior a la transfección y mejora la viabilidad celular.^{58,60}

En este aspecto, se ha desarrollado un sistema de edición génica basado en nanopartículas, compuesto por un polímero biodegradable (PEG-PC) y un polímero catiónico modificado con colesterol (PEI-CHO), que encapsulan el plásmido con Cas9. Este sistema protege el DNA de la degradación por nucleasas, facilita la internalización celular y mejora la eficiencia de la edición génica. En comparación con métodos tradicionales, este enfoque ha demostrado una mayor biocompatibilidad, retención tumoral prolongada y capacidad para silenciar genes específicos tanto in vitro como in vivo.⁶⁰

Aunque las LNPs han demostrado una alta eficiencia en la entrega génica in vivo, su limitada estabilidad térmica, la necesidad de conservación a temperaturas ultrabajas y la variabilidad entre lotes comprometen su aplicabilidad clínica a gran escala. La estandarización de protocolos y la optimización de la formulación serán determinantes para su futura viabilidad en terapias génicas avanzadas como CAR-T.⁶¹

6.3 Resumen de los resultados comparados de nanopartículas frente a vectores virales en la terapia CAR-T

Los resultados en la tecnología CART muestran diferencias notables entre el uso de nanopartículas y vectores virales en la terapia con células CAR-T, especialmente en estos aspectos:

1. Eficiencia de transfección:

Las nanopartículas lipídicas y poliméricas no son tan eficientes como los lentivirus y retrovirus gamma en la integración del gen CAR en el genoma de las células T.^{60,62}

2. Toxicidad:

En general, las NP se asocian a niveles menores de toxicidad. Al encapsular el material genético, estas protegen las células T contra daños y reducen la apoptosis posterior a la transfección. En contraste, los

vectores virales pueden inducir mutagénesis por inserción y otros efectos adversos debido a la integración aleatoria en el genoma. ^{48,51}

3. Activación inmune:

Las nanopartículas diseñadas de forma óptima tienen la capacidad de evadir la activación de sensores intracelulares de DNA. Por su parte, los vectores virales pueden estimular respuestas inmunitarias debido a la presencia de secuencias y proteínas virales residuales. ^{51,63}

4. Escalabilidad:

Desde el punto de vista de la producción, las NP ofrecen una plataforma más rentable y escalable para la generación de células CAR-T. Su fabricación es más sencilla y menos costosa en comparación con la producción de vectores virales, que requiere cumplir con estrictas condiciones de buenas prácticas de manufactura. ⁶²

Esta imagen ilustra NP PEGiladas y su capacidad de evasión de las respuestas inflamatorias. Las LNPs presentan una inmunogenicidad reducida y protegen el RNAm en las construcciones CAR-T mediante una capa lipídica, resguardándolo de endonucleasas, citocinas y evitando el riesgo de mutagénesis por inserción, lo que previene la activación de oncogenes o la inhibición de genes supresores de tumores. ⁶⁴

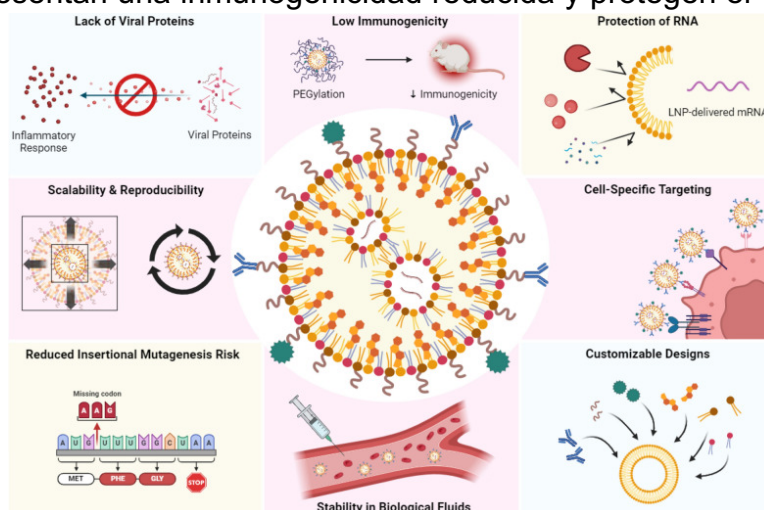


Figura 3. Seguridad y eficiencia de las NP lipídicas.

Imagen obtenida de Khawar MB et al. *J Nanobiotech.* (2024), 22 Ref: ⁶⁴

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo, se ha efectuado una revisión exhaustiva de la literatura científica utilizando bases de datos académicas como *PubMed* o *UpToDate*. Los criterios de búsqueda han incluido términos como “*nanomedicine and CAR-T*”, “*nanoparticles and gene delivery*”, “*non-viral vectors and cell therapy*”, y “*nanotechnology and T cell engineering*”. Se han priorizado artículos revisados, estudios recientes y ensayos clínicos relevantes. También se han consultado documentos regulatorios de agencias como la FDA.

Se han incluido publicaciones que abordaran el uso de nanomateriales para la entrega de material genético en células T, con especial énfasis en su aplicación en terapias CAR-T. Se han excluido estudios enfocados únicamente en terapias convencionales sin implicación nanotecnológica o aquellos que no proporcionaban resultados experimentales concluyentes.

Se han comparado diferentes estrategias de administración genética (viral vs no viral) en el contexto de la generación de células CAR-T, evaluando parámetros como eficiencia de edición, toxicidad, respuesta inmunitaria, escalabilidad y costes de producción. Asimismo, se han revisado enfoques que integran CRISPR/Cas9 con nanopartículas para una edición más precisa.

Las referencias bibliográficas utilizadas en este trabajo han sido gestionadas por el gestor bibliográfico Mendeley y citadas siguiendo el estilo de referencia Nature, el cual es ampliamente utilizado en publicaciones científicas y se basa en la numeración consecutiva de las citas en el texto, con los detalles completos de cada fuente listados en la sección de bibliografía al final del trabajo.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta revisión bibliográfica, se ha demostrado que la nanomedicina cumple con los objetivos previamente establecidos en el desarrollo de terapias celulares, específicamente en el contexto de las células CAR-T.

Los estudios revisados confirman que el uso de nanomateriales para la transducción génica de linfocitos T supera las limitaciones de los vectores virales, logrando una entrega más precisa y controlada del material genético, lo que reduce los riesgos de mutagénesis e inmunogenicidad. Además, se ha comprobado que algunos sistemas basados en nanomateriales mejoran la eficiencia de la producción de células CAR-T optimizando los costos y tiempos de fabricación, consiguiendo la encapsulación de moléculas grandes de DNA, mejorando estabilidad de los cargos transportados y su direccionamiento.

Aunque los resultados son prometedores, es necesario continuar con la investigación para resolver desafíos relacionados con la biocompatibilidad y la optimización de los nanosistemas para su aplicación clínica.

9. CONCLUSIONES

- La nanomedicina ofrece sistemas de entrega no virales, como las nanopartículas, que facilitan la transducción génica y la expresión de proteínas CARs de manera más segura. Estos sistemas reducen la mutagénesis insercional, minimizan los altos costos de la producción viral y mejoran la reproducibilidad de la tecnología de traducción.
- La combinación de nanotecnología con herramientas como CRISPR-Cas9 o sistemas como el *PiggyBac*, facilita una edición dirigida y controlada del genoma, permitiendo integrar el CAR en locus específicos, lo que mejora la regulación de su expresión y reduce el agotamiento de los linfocitos T.
- La nanomedicina no solo actúa a nivel celular, sino también en el microambiente tumoral, al permitir la entrega selectiva de inmunomoduladores

que potencian la respuesta inmunitaria y favorecen la actividad antitumoral de las terapias celulares.

- Gracias a su versatilidad, escalabilidad y bajo coste, las estrategias basadas en nanotecnología facilitan el desarrollo de productos celulares personalizados, universales y económicos, acercando las terapias CAR-T a un mayor número de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Su, H. *et al.* Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *Journal of Applied Toxicology* vol. 38 3–24 <https://doi.org/10.1002/jat.3476> (2018).
2. Gonzalez-Valdivieso, J., Girotti, A., Schneider, J. & Arias, F. J. Advanced nanomedicine and cancer: Challenges and opportunities in clinical translation. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 599 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120438> (2021).
3. Fan, D. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y> (2023).
4. Zhao, C., Tan, A., Pastorin, G. & Ho, H. K. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology Advances* vol. 31 654–668 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.001> (2013).
5. Abdollahiyan, P., Oroojalian, F. & Mokhtarzadeh, A. The triad of nanotechnology, cell signalling, and scaffold implantation for the successful repair of damaged organs: An overview on soft-tissue engineering. *Journal of Controlled Release* vol. 332 460–492 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.036> (2021).
6. Lavik, E. & Von Recum, H. The role of nanomaterials in translational medicine. *ACS Nano* vol. 5 3419–3424 <https://doi.org/10.1021/nn201371a> (2011).
7. nanomedicina 2.
8. Puppi, J. *et al.* Ex vivo magnetic resonance imaging of transplanted hepatocytes in a rat model of acute liver failure. *Cell Transplant* 23, 329–343 (2014).
9. Nawaz, W. *et al.* Nanotechnology and immunoengineering: How nanotechnology can boost CAR-T therapy. *Acta Biomaterialia* vol. 109 21–36 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.015> (2020).
10. Han, B., Song, Y., Park, J. & Doh, J. Nanomaterials to improve cancer immunotherapy based on ex vivo engineered T cells and NK cells. *Journal of Controlled Release* vol. 343 379–391 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.049> (2022).
11. *The Nanomedicine Revolution, Part 1: Emerging Concepts.*
12. Martínez Torreblanca, A., Tirado Hernández, J., Villalpando Castro, D. & Villapudua Rodríguez, G. Nanomedicina desde una perspectiva tecnológica. Revisión de literatura. *Revista de Investigación en Tecnologías de la Información* 8, 56–65 (2020).

13. Kim, J., Hong, J., Lee, J., Fakhraei Lahiji, S. & Kim, Y. H. Recent advances in tumor microenvironment-targeted nanomedicine delivery approaches to overcome limitations of immune checkpoint blockade-based immunotherapy. *Journal of Controlled Release* vol. 332 109–126 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.002> (2021).
14. Diep, Y. N., Kim, T. J., Cho, H. & Lee, L. P. Nanomedicine for advanced cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release* vol. 351 1017–1037 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.004> (2022).
15. Accesss, O. *et al.* Trendss inn Pharmacologicall Sciences Advancess inn celll therapy:: progressss andd challengess inn hematologicall and solidd tumorss. doi:10.1016/j.tips.2024.10.0166.
16. *Medicina Universitaria Editorial*. www.elsevier.es (2012).
17. Wendel, P. *et al.* Arming immune cells for battle: A brief journey through the advancements of t and nk cell immunotherapy. *Cancers* vol. 13 <https://doi.org/10.3390/cancers13061481> (2021).
18. Yannelli, J. R. & Wroblewski, J. M. On the road to a tumor cell vaccine: 20 Years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 23, 97–113 (2004).
19. Pinte, L., Cunningham, A., Trébédén-Negre, H., Nikiforow, S. & Ritz, J. Global Perspective on the Development of Genetically Modified Immune Cells for Cancer Therapy. *Frontiers in Immunology* vol. 11 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608485> (2021).
20. Han, J. *et al.* The Progress and Prospects of Immune Cell Therapy for the Treatment of Cancer. *Cell Transplantation* vol. 33 <https://doi.org/10.1177/09636897241231892> (2024).
21. Shi, Y. & Lammers, T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. *Acc Chem Res* 52, 1543–1554 (2019).
22. Khosravi, N., Pishavar, E., Baradaran, B., Oroojalian, F. & Mokhtarzadeh, A. Stem cell membrane, stem cell-derived exosomes and hybrid stem cell camouflaged nanoparticles: A promising biomimetic nanoplatfroms for cancer theranostics. *Journal of Controlled Release* vol. 348 706–722 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.06.026> (2022).
23. Rahimkhoei, V., Akbari, A., Jassim, A. Y., Hussein, U. A. R. & Salavati-Niasari, M. Recent advances in targeting cancer stem cells by using nanomaterials. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 673 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125381> (2025).
24. Chen, W., Fu, L. & Chen, X. Improving cell-based therapies by nanomodification. *Journal of Controlled Release* 219, 560–575 (2015).
25. Ku, K. S., Tang, J., Chen, Y. & Shi, Y. Current Advancements in Anti-Cancer Chimeric Antigen Receptor T Cell Immunotherapy and How Nanotechnology May Change the Game. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 25 <https://doi.org/10.3390/ijms25105361> (2024).
26. Su, H. *et al.* Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *Journal of Applied Toxicology* vol. 38 3–24 <https://doi.org/10.1002/jat.3476> (2018).
27. Rehan, F., Zhang, M., Fang, J. & Greish, K. Therapeutic Applications of Nanomedicine: Recent Developments and Future Perspectives. *Molecules* vol. 29 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules29092073> (2024).

28. Gil-Cabrerizo, P., Scacchetti, I., Garbayo, E. & Blanco-Prieto, M. J. Cardiac tissue engineering for myocardial infarction treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 185, (2023).
29. Nasr, S. M. *et al.* Biodegradable nanopolymers in cardiac tissue engineering: From concept towards nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine* vol. 15 4205–4224 <https://doi.org/10.2147/IJN.S245936> (2020).
30. Mitra, A. *et al.* From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Frontiers in Immunology* vol. 14 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188049> (2023).
31. Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B. & Brenner, M. K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev* 257, 107–126 (2014).
32. Sadelain, M. CAR therapy: The CD19 paradigm. *Journal of Clinical Investigation* vol. 125 3392–3400 <https://doi.org/10.1172/JCI80010> (2015).
33. Uscanga-Palomeque, A. C. *et al.* CAR-T Cell Therapy: From the Shop to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 <https://doi.org/10.3390/ijms242115688> (2023).
34. Vandghanooni, S., Eskandani, M., Sanaat, Z. & Omid, Y. Recent advances in the production, reprogramming, and application of CAR-T cells for treating hematological malignancies. *Life Sciences* vol. 309 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121016> (2022).
35. Qayed, M. *et al.* Leukapheresis guidance and best practices for optimal chimeric antigen receptor T-cell manufacturing. *Cytotherapy* vol. 24 869–878 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.05.003> (2022).
36. Naeem, M. *et al.* Explorations of CRISPR/Cas9 for improving the long-term efficacy of universal CAR-T cells in tumor immunotherapy. *Life Sciences* vol. 316 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121409> (2023).
37. Alnasser, S. M. Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. *Gene* vol. 769 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145246> (2021).
38. Ayala Ceja, M., Khericha, M., Harris, C. M., Puig-Saus, C. & Chen, Y. Y. CAR-T cell manufacturing: Major process parameters and next-generation strategies. *Journal of Experimental Medicine* vol. 221 <https://doi.org/10.1084/jem.20230903> (2024).
39. Mahadeo, K. M. *et al.* Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 16 45–63 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0075-2> (2019).
40. Sterner, R. C. & Sterner, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7> (2021).
41. Hudecek, M. *et al.* The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res* 3, 125–135 (2015).
42. Jensen, M. C. & Riddell, S. R. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Current Opinion in Immunology* vol. 33 9–15 <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.002> (2015).

43. Bridgeman, J. S. *et al.* The Optimal Antigen Response of Chimeric Antigen Receptors Harboring the CD3 ζ Transmembrane Domain Is Dependent upon Incorporation of the Receptor into the Endogenous TCR/CD3 Complex. *The Journal of Immunology* 184, 6938–6949 (2010).
44. Alabanza, L. *et al.* Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Molecular Therapy* 25, 2452–2465 (2017).
45. Huang, J., Huang, X. & Huang, J. CAR-T cell therapy for hematological malignancies: Limitations and optimization strategies. *Frontiers in Immunology* vol. 13 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1019115> (2022).
46. Chen, Y. J., Abila, B. & Mostafa Kamel, Y. CAR-T: What Is Next? *Cancers* vol. 15 <https://doi.org/10.3390/cancers15030663> (2023).
47. Chohan, K. L., Siegler, E. L. & Kenderian, S. S. CAR-T Cell Therapy: the Efficacy and Toxicity Balance. *Current Hematologic Malignancy Reports* vol. 18 9–18 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11899-023-00687-7> (2023).
48. Irving, M., Lanitis, E., Migliorini, D., Ivics, Z. & Guedan, S. Choosing the Right Tool for Genetic Engineering: Clinical Lessons from Chimeric Antigen Receptor-T Cells. *Hum Gene Ther* 32, 1044–1058 (2021).
49. Raes, L., De Smedt, S. C., Raemdonck, K. & Braeckmans, K. Non-viral transfection technologies for next-generation therapeutic T cell engineering. *Biotechnology Advances* vol. 49 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107760> (2021).
50. Billingsley, M. M. *et al.* In Vivo mRNA CAR T Cell Engineering via Targeted Ionizable Lipid Nanoparticles with Extrahepatic Tropism. *Small* 20, (2024).
51. Fan, M. *et al.* Nanoparticle-mediated universal CAR-T therapy. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 666 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124779> (2024).
52. Meenakshi Sundaram, D. N., Bahadur K. Fu, W. & Uludağ, H. An optimized polymeric delivery system for piggyBac transposition. 121, 1503–1517 (2024).
53. Mucha, M. *et al.* Good manufacturing practice-grade generation of CD19 and CD123-specific CAR-T cells using piggyBac transposon and allogeneic feeder cells in patients diagnosed with B-cell non-Hodgkin lymphoma and acute myeloid leukemia. 15, (2024).
54. Zheng, Y. *et al.* PiggyBac Transposon System with Polymeric Gene Carrier Transfected into Human T Cells. *Am J Transl Res* vol. 11 (2019).
55. Kath, J. *et al.* Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 25, 311–330 (2022).
56. Eyquem, J. *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 543, 113–117 (2017).
57. Lim, J. *et al.* Enhancing Chimeric Antigen Receptor T-Cell Generation via Microfluidic Mechanoporation and Lipid Nanoparticles. *Small* (2025) [doi:10.1002/smll.202410975](https://doi.org/10.1002/smll.202410975).
58. Kazemian, P. *et al.* Lipid-Nanoparticle-Based Delivery of CRISPR/Cas9 Genome-Editing Components. *Molecular Pharmaceutics* vol. 19 1669–1686 <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00916> (2022).

59. Huang, C., Han, Z., Evangelopoulos, M. & Mirkin, C. A. CRISPR Spherical Nucleic Acids. *J Am Chem Soc* 144, 18756–18760 (2022).
60. Li, Y. *et al.* Polymeric micellar nanoparticles for effective CRISPR/Cas9 genome editing in cancer. *Biomaterials* 309, (2024).
61. Pinto, I. S., Cordeiro, R. A. & Faneca, H. Polymer- and lipid-based gene delivery technology for CAR T cell therapy. *Journal of Controlled Release* vol. 353 196–215 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.038> (2023).
62. Rossi, M. & Breman, E. Engineering strategies to safely drive CAR T-cells into the future. *Frontiers in Immunology* vol. 15 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1411393> (2024).
63. Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C. & Herzog, R. W. Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Molecular Therapy* vol. 28 709–722 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001> (2020).
64. Khawar, M. B., Afzal, A., Si, Y. & Sun, H. Steering the course of CAR T cell therapy with lipid nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 22 <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02630-1> (2024).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento y admiración por su trabajo, a mis tutoras, Mónica y María. Gracias por vuestra dedicación, motivación y paciencia durante la elaboración de este trabajo.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Universidad de Cantabria por la excelente formación recibida a lo largo de estos años. Asimismo, valoro profundamente la oportunidad de haber conocido a personas extraordinarias que hoy considero grandes amigos, y con quienes he compartido esta etapa, haciendo de ella una experiencia verdaderamente inolvidable.

Por último, quiero agradecer al pilar fundamental de mi vida: mi familia. Gracias por el apoyo incondicional brindado durante toda mi vida y especialmente durante estos seis años de carrera, por animarme y por entender las horas dedicadas a esta. Sin ellos no hubiera llegado a ser la persona en la que me he convertido. Gracias Mamá, Papá y Lucía por siempre creer en mí.