

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA  
TRABALLO FIN DE GRAO DE MEDICINA



Avances da bioloxía molecular e celular na aplicación biomédica: Edición xenómica, terapia xénica e inmunoterapia

Loureiro Veira, Martiño

Titor: Dr. Ángel María Carracedo Álvarez

Cotitora: Dra. Catarina Allegue Toscano

Departamento: Medicina Xenómica

Curso 2020

Convocatoria: Xullo 2020

## Índice

1. Resumo .....	3
2. Introducción .....	4
3. Obxectivos e metodoloxía .....	6
4. Edición xenómica .....	7
4.1 Roturas de dobre cadea.....	7
4.2 Sistemas de edición xenómica.....	9
4.2.1 ZFNs e TALENs.....	9
4.2.2 CRISPR-Cas9 .....	10
4.2.3 Ferramentas emerxentes .....	15
4.2.4 Outras técnicas de edición xenómica.....	16
4.3 O transporte nos sistemas de edición.....	17
4.3.1 Métodos físicos.....	17
4.3.2 Métodos químicos .....	17
4.3.3 Vectores virais e non virais, transporte <i>in vivo</i> .....	18
4.4 Aplicacións preclínicas.....	20
5. Terapia xénica.....	21
5.1 Estratexias e fármacos aprobados.....	21
5.2 Edición xenética en terapia xénica .....	27
6. Inmunoterapia.....	30
6.1 Neoplasia e resposta inmune .....	30
6.2 Estratexias de inmunoterapia.....	30
6.3 Células CAR T .....	32
6.3.1 Concepto. CAR Ts aprobadas .....	32
6.3.2 Universalidade e efectos adversos.....	35
6.3.3 Novas xeracións de CAR T .....	36
6.3.4 CAR T e inhibidores de <i>checkpoints</i> .....	39
6.3.5 Papel de CRISPR-Cas9 nas novas CAR T .....	39
7. Abreviacións.....	41
8. Bibliografía.....	42

## **Índice de táboas**

- Táboa 1: Ortólogos de Cas9 e PAMs .....13
- Táboa 2: Tecnoloxías CRISPR.....15
- Táboa 3: Fármacos aprobados para terapia xénica.....27
- Táboa 4: Ensaio con CAR Ts aprobadas.....34
- Táboa 5: Estratexias na cuarta xeración de CAR Ts.....38

## **Índice de figuras**

- Figura 1: Rutas de reparación de roturas de dobre cadea.....8
- Figura 2: Representación comparativa das endonucleases.....9
- Figura 3: Representación do sistema CRISPR .....11
- Figura 4: Estrutura de CRISPR-Cas9.....12
- Figura 5: Sinais TCR e coestimuladoras. Esquema dun CAR.....33

## 1. Resumo

Nos últimos anos describíronse distintas ferramentas de edición xenómica, e novas están a emerxer baseadas no sistema CRISPR-Cas9. Este, que emprega á proteína Cas9 cun sgRNA como guía, destaca pola súa eficiencia, accesibilidade e versatilidade, sendo aplicado en campos diversos. Con todo, presenta algúns inconvenientes, como os efectos *off-target*, que teñen que ser tidos en conta na súa aplicación. Na clínica, as ferramentas de edición xenómica emprégase experimentalmente para tratar enfermidades xenéticas *in vivo* e *ex vivo*, modificando células do paciente como proxenitores hematopoéticos. Nesta revisión estudaremos o funcionamento destas ferramentas, as técnicas de transporte e, a través dunha visión de conxunto da terapia xénica e a inmunoterapia contra o cancro, a súa aplicación ao tratamento de enfermidades xenéticas e o seu papel no desenvolvemento de novas células CAR T.

## 2. Introducción

Os avances en bioloxía molecular dos últimos tempos teñen o potencial para cambiar a forma na que se manexa a enfermidade xenética no campo da biomedicina. Se hai só trinta anos se estaba a buscar coñecer a secuencia do noso xenoma, hoxe non só temos medios técnicos para poder coñecer a secuencia dun individuo en concreto con certa facilidade, senón que dispoñemos de ferramentas para cambiala. Con elas, entramos nunha nova era na que se poderá ofrecer tratamentos curativos para pacientes con enfermidades xenéticas baseados na edición dos xenes causais (1).

A edición xenómica consiste en cambiar o ADN dunha célula cunha precisión tal que se pode lograr unha especificidade dun só nucleótido. Para iso, dispoñemos dunha serie de sistemas baseados en endonucleases programables, entre as que destaca polas súas vantaxes o sistema CRISPR-Cas9. Estas enzimas permiten facer cortes no ADN e causar deleccións, alteracións do marco de lectura e insercións de novo material xenético. Tamén están a emerxer novas estratexias de edición xenómica, que expoñeremos brevemente, como o *base editing* ou o *prime editing*. Os primeiros avances na tecnoloxía de edición xenética remóntanse a 1994, cando se describiu que roturas de dobre cadea estimulaban a recombinación homóloga, permitindo a inserción de novas secuencias no ADN. Dous anos máis tarde, en 1996, deseñase a primeira nucleasa con dedos de zinc (ZFN), que se emprega durante a primeira década dos anos 2000, conseguíndose en 2008 o *knockout* (KO) de CCR5 en linfocitos T humanos. Ao ano seguinte, 2009, descríbese o código das TAL, que leva ao deseño en 2010 das primeiras TALENs, que son empregadas aínda hoxe en día. Pero foi en 2012 cando se desenvolve o sistema CRISPR-Cas9, baseándose nos CRISPR bacterianos, que ata os nosos días demostrou gran utilidade tanto *in vitro* coma *in vivo* na edición de células humanas (2).

Entendemos o concepto de terapia xénica como a indución da expresión dunha secuencia de material xenético (secuencia terapéutica) en células ou tecidos para a regulación, reparación, substitución, adición ou delección dunha secuencia xenética (3), para curar ou aliviar a sintomatoloxía dunha enfermidade cos mínimos efectos adverso. As ferramentas de edición xenómica permítenos facer cambios na secuencia de ADN de células humanas para terapia xénica tanto *ex vivo* como *in vivo*, con limitacións que veremos máis adiante. As enfermidades monoxénicas, ou de herdanza mendeliana, son posiblemente a aplicación máis evidente. Son aquelas enfermidades cuxa causa é unha mutación nun xene, e que se herda segundo patróns mendelianos, en contraposición ás enfermidades complexas onde a carga xenética supón unha parte da causa, combinándose con factores ambientais. Son na súa maioría enfermidades raras, considerando a definición europea (4), cunha frecuencia inferior a menos de 5 casos por cada 10000 persoas, pero que se estima que en conxunto poderían afectar a un total de 350 millóns de persoas no mundo. Ademais de seren dificilmente diagnosticadas na clínica pola súa baixa frecuencia e o descoñecemento das mesmas, o seu tratamento tamén é unha barreira: distintas administracións tratan de facilitar o desenvolvemento de novos “fármacos orfos” para estas enfermidades que tradicionalmente non estaban na diana da investigación farmacolóxica. Por un lado, a xenética resulta unha ferramenta indispensable hoxe en día no diagnóstico e caracterización destas patoloxías. Por outro, a terapia xénica abriu unha nova vía de tratamento para estes pacientes, e hai xa fármacos aprobados para algunhas enfermidades, coma a distrofia

muscular espiñal (nusinersen), a inmunodeficiencia severa combinada por déficit de ADA (strimvelis) ou a distrofia muscular de Duchenne (eteplirsen) (5,6).

Mais a edición xenética ten aplicacións clínicas máis alá da terapia xénica. A inmunoterapia é unha forma de tratamento que ten como obxectivo desencadear, modular ou dirixir a resposta inmune do suxeito, e no cancro trata de desencadear a fronte á neoplasia. Unha forma de inmunoterapia son as CAR T, linfocitos T do paciente modificados para recoñecer antíxenos do tumor e activarse contra el. Como veremos, a edición xenética xoga un papel fundamental no desenvolvemento de novas CAR T (7).

Para o desenvolvemento desta clase de avances na biomedicina son necesarios equipos multidisciplinares, debido ao carácter transversal dos problemas que se presentan. Dende a bioinformática, que é vital non xa para facer modelos *in silico* de terapias ou técnicas, senón para algo tan básico como poder procesar, analizar e interpretar a inxente cantidade de datos que se obteñen no cribado xenético. Datos que tamén teñen que ser interpretados dende o punto de vista biolóxico para finalmente asociar a variación xenética co desenvolvemento da patoloxía en cuestión. Pero tamén a bioquímica, viroloxía, inmunoloxía... por citar algunhas disciplinas cuxo ámbito está directamente relacionado, e por suposto, a xenética e a bioloxía molecular e celular. O obxectivo será a translación dos descubrimentos na investigación básica aos estudos clínicos. O médico, pertencendo a un equipo clínico, debe servir de eixo entre o paciente e o investigador, para que poidan facer entre todos dita translación. E para isto, é imprescindible que coñeza os avances que acontecen na investigación.

Nesta revisión preténdese ofrecer unha visión de conxunto por un lado sobre as ferramentas de edición xenómica, centrándonos no sistema CRISPR-Cas9, e por outro nos ámbitos de aplicación na clínica, a terapia xénica e a inmunoterapia, camiñando cada vez máis cara a unha medicina personalizada.

### 3. Obxectivos e metodoloxía

Co seguinte traballo preténdese revisar a bibliografía sobre as técnicas de edición xenética existentes, prestando especial atención ao sistema CRISPR-Cas9, e a súa aplicación na clínica. Para isto, ofrecerase unha visión de conxunto dos eidos da terapia xénica e a inmunoterapia, revisando as distintas estratexias terapéuticas empregadas actualmente que se encadran neles, e explorando máis exhaustivamente aquelas onde a edición xenética ten maior relevancia.

Para a busca de información, empregouse a base de datos *PubMed* da *U.S. National Library of Medicine* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), tratando de incluír publicacións o máis recentes posible, coa fin de reflexar na revisión os últimos avances nestes campos. Para a busca de ensaios clínicos empregouse o rexistro *ClinicalTrials* da *U.S. National Library of Medicine* (<https://clinicaltrials.gov/>). As buscas foron guiadas pola patoloxía ou pola intervención terapéutica (“*Fabry disease*”, “*nusinersen*” ou “*thalassemia; gene therapy OR biologic*”). Os resultados foron filtrados segundo a adecuación á busca realizada e o estado do ensaio clínico, excluindo aqueles cuxos resultados xa foran consultados a través doutra fonte, así como aqueles que foran cancelados antes de comezar ou cuxo estado fose descoñecido. Tamén se consultaron as páxinas da Axencia Europea do Medicamento (EMA) (<https://www.ema.europa.eu/en>), da *Food and Drug Administration* (FDA) (<https://www.fda.gov/>), da Axencia Española do Medicamento (AEMPS) (<https://www.aemps.gob.es/>), así como as páxinas dos proxectos OMIM (<https://omim.org/>) e *Orphanet* (<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>).

## 4. Edición xenómica

Antes de comezar a desenvolver as diferentes ferramentas de edición xenética, e debido a que a maioría delas se basean en provocar roturas de dobre cadea no ADN da célula, exporemos os dous mecanismos principais de reparación: a recombinación non homóloga ou NHEJ, (do inglés *nonhomologous end joining*) e a recombinación homóloga (HR).

### 4.1 ROTURAS DE DOBRE CADEA

Segundo que mecanismo de reparación vaia a darse na célula, os extremos das cadeas adxacentes ao corte sufrirán uns procesos ou outros (Figura 1). Os extremos atoparanse conservados como romos, feito promovido pola unión aos mesmos da proteína Ku, cando se produza a NHEJ. Nesta interveñen nucleases, polimerases e ligases ademais de outras moléculas que actúan como cofactores. De entre as nucleases destaca a Artemis, que actúa en complexo con protein quinases dependentes de ADN, evita que se formen estruturas aberrantes (*hairpins*) no extremo romo do ADN e semella imprescindible para a posterior formación dunha unión estable. De entre as polimerases podemos enumerar as Pol mu e Pol lambda, capaces de interactuar con Ku e xerar homoloxías entre os extremos mediante a adición sen moldes de nucleótidos. A ligases como o complexo Lig4-XRCC4 serían as moléculas encargadas de estabilizar definitivamente a reparación do fragmento. Estes complexos moleculares son moi flexibles á hora de actuar, sendo este mecanismo o máis utilizado polas nosas células, pero tamén producen resultados heteroxéneos. De feito, o máis frecuente neste tipo de reparación é que se produzan erros. As actividades de Artemis e as polimerases poden causar microdeleicións e microinsercións respectivamente, o que altera o marco de lectura (8).

Para que se produza a recombinación homóloga é necesaria unha secuencia de ADN homóloga á secuencia que se repara (en azul na figura). Esta secuencia adoita provir da cromátide irmá, pois existen mecanismos que evitan o uso do cromosoma homólogo. Deste xeito, a recombinación homóloga só é posible en fases do ciclo celular onde existe dita cromátide, fases S e G2. Ao comezo actúa sobre a secuencia o complexo MRN, que produce unha resección nunha das febras dos extremos da rotura, convertendo ditos extremos en cohesivos. Posteriormente únese a proteína RPA, que permite á súa vez a participación de outras (como a RAD51 ou as BRCA) e catalízase un armazón filamentoso sobre o extremo. Este vai levar á invasión dunha dobre febra de ADN (en azul na figura) que se estabiliza nun bucle D (*D-loop formation*) en presenza dun nivel de homoloxía elevado, proceso que leva á formación dun heterodímero. A secuencia homóloga dirixirá a síntese da cadea cortada, que posteriormente será estabilizada a través de ligases, resultando na reparación do dano. Estes procesos están influenciados polo grado de pregamento do ADN, e vense influídos por topoisomerases que alteran a conformación do mesmo. Ademais, tamén está descrita outra estrutura chamada *double Holiday junction*, na que se produce unha invasión mutua das febras, pero que é menos importante cuantitativamente falando. Finalmente, existen outras rutas secundarias, pero que non abordaremos por seren menos relevantes (9).

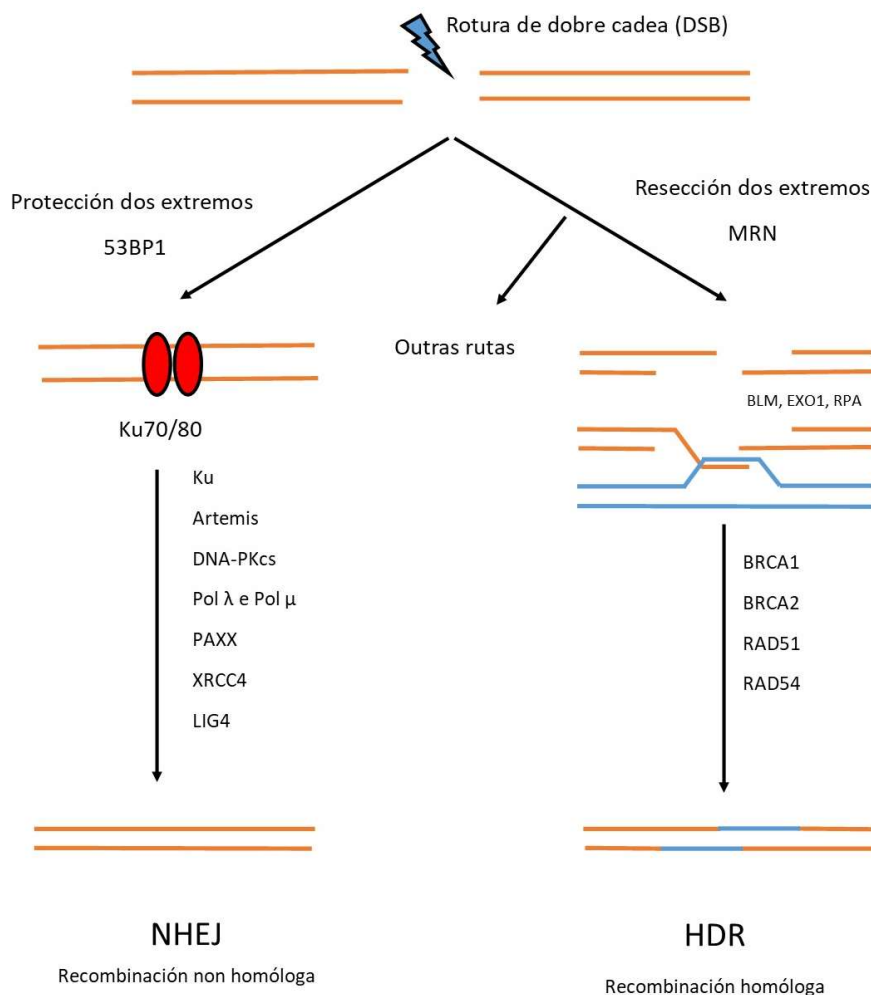


Figura 1: principais rutas de reparación das roturas de dobre cadea e enzimas implicadas, segundo a homoloxía necesaria. Figura adaptada de (8)

Estes procesos son clave para os métodos de edición xenética que veremos a continuación. A recombinación non homóloga (NHEJ) tende a desprazar o marco de lectura dentro dun xene: unha delección dun só nucleótido altera o agrupamento de nucleótidos a partires del (tres nucleótidos, un códon, un aminoácido) polo que alterará todos eses codóns, con probabilidades de xerar un codón de parada prematuro. Deste xeito, a reparación por este método facilita a obtención de KOs, ou sexa células ou organismos modificados para perder a expresión dun xene. Doutro banda, a recombinación homóloga (HDR) é o procedemento polo que unha célula pode introducir un transxene nunha rexión concreta, se lle subministramos un fragmento de ADN cunha secuencia homóloga en torno á rotura. Polo tanto, tamén se fai importante poder modular a resposta celular segundo os nosos intereses. Por exemplo, a HDR só é posible durante certas fases do ciclo celular (S e G2) nas que a replicación do ADN está completa e as cromátides irmás están dispoñibles para servir de molde (10). Así que técnicas coma a sincronización do ciclo celular con nocodazol e ABT-751 son especialmente útiles para minimizar reparacións polo proceso non desexado. Sería idóneo poder inhibir as moléculas que producen a NHEJ cando se pretende facer unha HDR, xa que se pensa que este induce insercións aleatorias cando se subministra ADN foráneo a unha célula, con consecuencias imprevisibles (11).

## 4.2 SISTEMAS DE EDICIÓN XENÓMICA

### 4.2.1 ZFNs e TALENs

Vimos que as roturas de dobre cadea son un punto de partida que nos permite tanto a introdución de material xenético foráneo como a alteración do marco de lectura. O uso de endonucleases programables demostrouse hai tempo como método para aumenta a eficiencia tanto dos fenómenos de NHEJ como de HDR en células animais (12,13). As endonucleases son enzimas con actividade catalítica sobre os enlaces entre nucleótidos localizados no interior dunha cadea de ADN (en contraposición ás exonucleases que actúan sobre os extremos). As endonucleases programables son enzimas de diversos orixes que actúan sobre secuencias que recoñecen de forma específica, con certas limitacións para cada enzima. Os sistemas baseados nelas son hoxe ferramentas clave á hora de manipular un xenoma, e empréganse as nucleases en dedos de zinc (ZFNs de agora en adiante), as nucleases asociadas a efectores semellantes a activadores da transcripción (TALENs) e a máis a Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR).

As ZFNs son proteínas formadas por dúas rexións diferenciadas: unha zona de unión ao ADN formada polos dedos de zinc e outra rexión de corte formada pola enzima *FokI* (Figura 2). Os dedos de zinc son estruturas proteicas que existen na natureza en forma modular, de uns 30 residuos de conformación  $\beta\beta\alpha$  ricos en cistina e histidina. Na cabeza da hélice  $\alpha$  teñen a capacidade de interactuar cunha secuencia de tres pares de bases, con relativa independencia dos módulos adxacentes. Construindo estruturas de tres a seis dedos de zinc de lonxitude podemos conseguir unha alta especificidade para recoñecer unha secuencia concreta (14). A enzima *FokI* é unha endonuclease de restrición capaz de producir unha rotura de dobre cadea cando dimeriza. O tipo salvaxe pode formar homodímeros, que reducirían a especificidade, pero hoxe empréganse formas modificadas que reducen a probabilidade de que isto suceda (15). Desta maneira, con dúas ZNFs, unha delas recoñecendo a secuencia previa ao punto de corte desexado e a outra a secuencia posterior, mantendo unha separación entre 5 e 7 pares de bases, formarase un heterodímero sobre o punto desexado, obtendo recoñecemento de secuencias de entre 18 e 36 pares de bases (15,16).

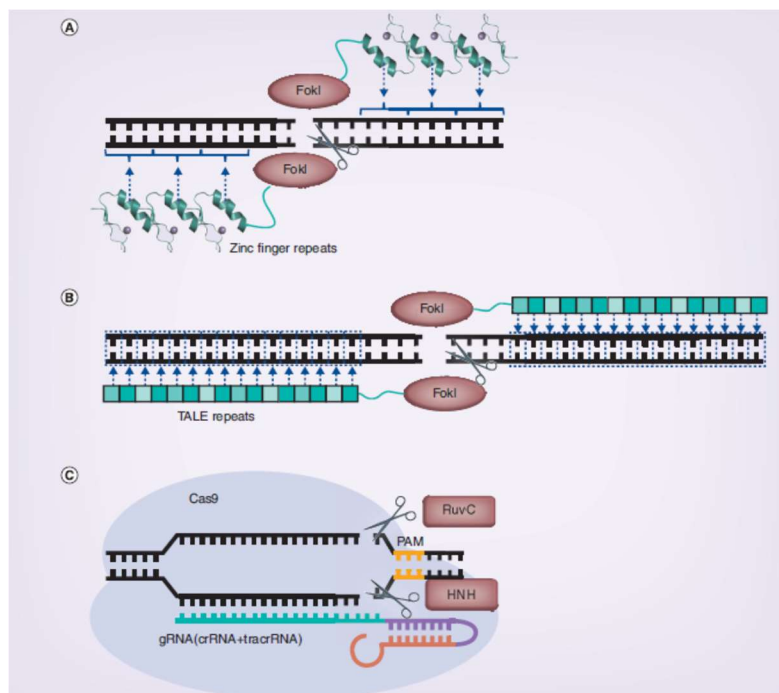


Figura 2: representación esquemática comparativa das tres endonucleases: A) ZFN, B) TALENs e C) CRISPR-Cas9. Figura obtida de (17)

Os ZFN teñen presentan certas debilidades como ferramenta de edición xenética. Non existen dedos de zinc capaces de recoñecer todas as combinacións de trinucleótidos, sendo máis eficientes en rexións ricas en guanina. Polo tanto, non permiten facer cortes en calquera porción do ADN, senón que é preciso atopar puntos específicos que posúan as combinacións que podemos recoñecer coas ZFN (Figura 2) (15). Ademais, non todas as ZNFs ensambladas son funcionais, e moitas que resultan útiles *in vitro* non o son despois *in vivo*, por exemplo porque a disposición tridimensional da cromatina lles impide o correcto acceso á secuencia (16). Finalmente, presentan unha taxa de éxito relativamente baixa, con alta capacidade citotóxica e con efectos *off-target*. (15) Todo isto fai que o deseño e a validación dunha ZFN para un locus específico sexa complexo e custoso, e por iso non son unha ferramenta amplamente empregada (18).

As TALENs son nucleases que comparten coas ZFNs a súa porción catalítica (a enzima *FokI*) pero que empregan os TALE como forma de unión ao ADN. Os TALE son proteínas que utilizan as proteobacterias do xénero *Xanthomonas* para alterar a expresión xenética dos vexetais que infectan. As TALEs naturais están formadas por repeticións altamente conservadas duns 35 aminoácidos, con dous residuos variables nas posicións 12 e 13. Pola conformación espacial da proteína en torno ao ADN, estes dous aminoácidos sitúanse no suco maior da hélice e interactúan cunha soa base nitroxenada (19). Deste xeito, describiuse que dependendo de cales sexan estes aminoácidos, recoñecerán unha ou outra base, seguindo un código que se mantén en TALEs deseñadas para outras dianas (20). Por isto, as TALENs poden actuar sobre calquera secuencia de ADN (Figura 2) coa condición que o extremo 5' remate nunha timina, aínda que a importancia desta limitación non está de todo clara, e algúns autores suxiren que unha citosina tamén sería válida (15,21). Deste xeito, presentan menos limitacións en canto á diana que as ZFNs. A metilación do ADN nas citosinas tamén pode ser un impedimento, aínda que pode ser solucionado na fase de deseño (15).

As TALENs son máis doadas de deseñar que as ZFNs, existindo ferramentas informáticas e bibliotecas de secuencias que facilitan o proceso. Hai diversos procesos de ensamblaxe como o *Golden Gate* que pretenden optimizar a súa síntese. Aínda así, o proceso segue sendo longo e complexo. Respecto ás ZFNs presentan tamén a vantaxe de inducir maiores taxas de mutación a través de NHEJ, menos efectos *off-target* e menor citotoxicidade (15).

#### 4.2.2 CRISPR-Cas9

CRISPR é a sigla de *Clustered Regularly Interspaced short Palindromic Repeats*, é dicir, secuencias palíndromas curtas repetidas e espazadas regularmente. Un primeiro bosquexo da súa existencia en *Escherichia coli* atópase nunha publicación de 1987 (22), onde os autores atopan unha estrutura formada por secuencias con simetría repetidas e separadas por outras secuencias curtas. Foi no ano 2000 cando o equipo de Mojica (23) describe e nomea estas secuencias repetitivas curtas, de 24 a 40 bp, espazadas por secuencias únicas de 20-58 bp en distintas bacterias e arqueas, tratándose dunha estrutura relativamente conservada. Neste traballo ademais atopan que estas secuencias contiñan dominios de unión a proteínas, polo que parecía existir un sistema proteico asociado. En 2005 diversos autores observaron que a orixe das secuencias que separaban as repeticións tiñan orixe viral, e xunto con outras publicacións que amosaban a existencia das Cas, proteínas asociadas a CRISPR, postulouse que o sistema funcionaba como sistema de defensa en procariotas (24). En 2008 demostrouse que un complexo de Cas pode empregar RNA para interferir a proliferación viral en *E. coli*. Tras unha serie de

fitos e descubrimentos que permitiron caracterizar mellor o sistema, en 2012 Doudna e Charpentier postulan o emprego da Cas9 como ferramenta de edición xenética (18).

Existen distintos sistemas CRISPR, pero todos eles integran tres procesos comúns: adaptación, bioxénese e interferencia (ver figura 3). No proceso de **adaptación**, o sistema integra dentro do cromosoma bacteriano unha porción de material xenético invasor, entre dúas das secuencias repetidas de CRISPR (*spacer*). No proceso de **bioxénese**, sintetízase e madura unha guía de RNA que guiará ás nucleases no proceso de **interferencia**, no cal se neutraliza o ADN foráneo. (25).

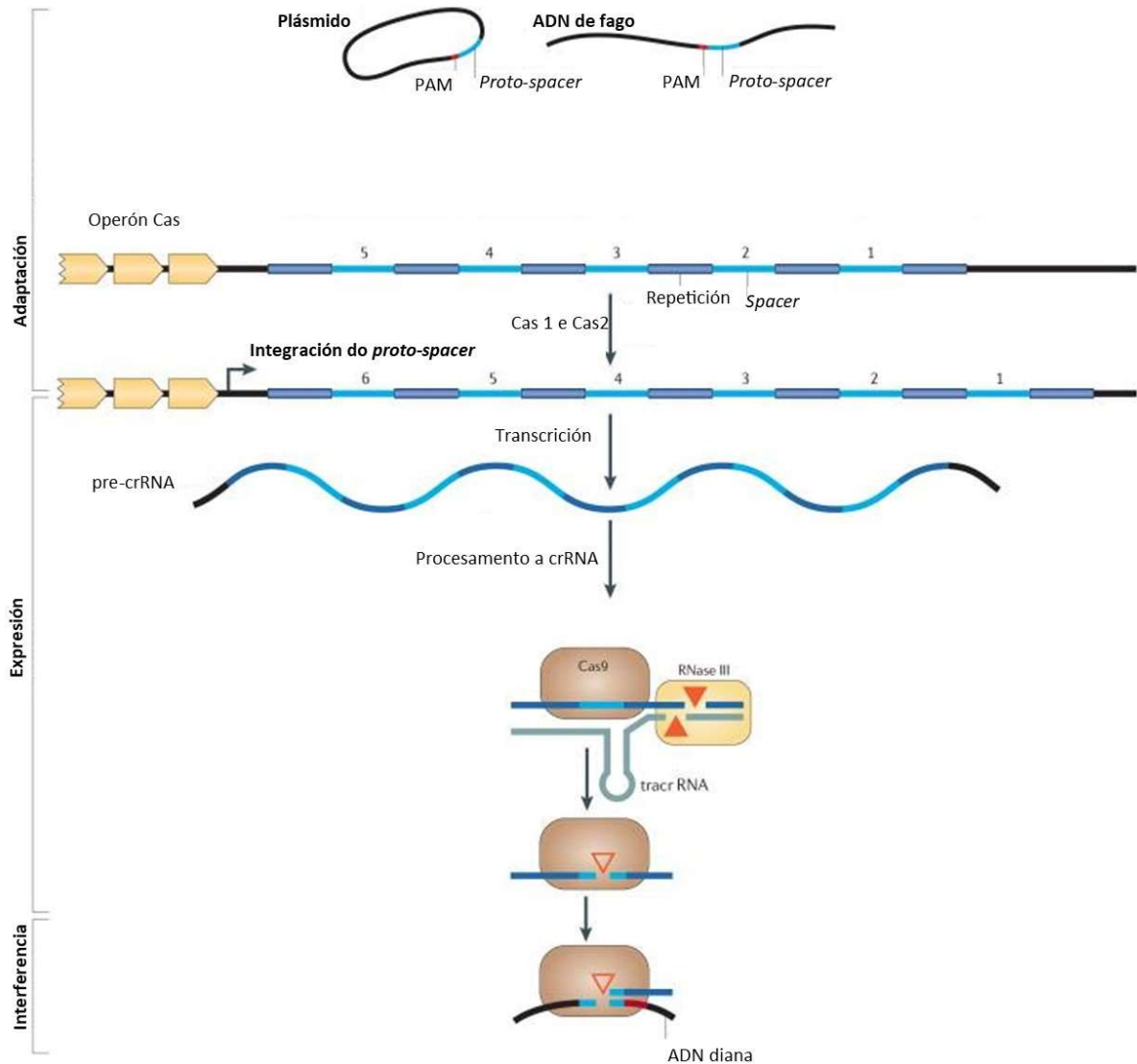


Figura 3: representación do sistema CRISPR de tipo II, onde se poden ver as tres fases do proceso (adaptación, expresión e interferencia) e os elementos celulares máis importantes que participan. Adaptado de (26).

Existen dúas clases de sistemas CRISPR, que tamén se dividen en tipos. Nos **sistemas de clase un** (tipos I, III e IV) emprégase un complexo proteico na interferencia, mentres que nos de **clase dous** (tipos II, V e VI) só é necesaria unha nucleasa. O tipo II (ver figura 3), cuxa nucleasa é **Cas9**, emprega un proceso de adaptación baseado no recoñecemento da **PAM**. A PAM é un motivo de tres nucleótidos na secuencia que recoñece a proteína Cas9, adxacente á diana (*protospacer*), pero que non atoparemos adxacente ao *spacer*. Na bioxénese, a célula expresa o *spacer*, formando un RNA (*pre-crRNA*) que sufrirá un proceso de maduración ata formar o **crRNA**. Este require dun segundo RNA (tracrRNA), que media a interacción en crRNA e Cas9. Agora, empregando o crRNA de guía, complementario do *protospacer* formado por material xenético foráneo, producirase a interferencia. Para Cas9 o recoñecemento da PAM é necesario para catalizar a rotura do ADN, e permite evitar que a nucleasa corte o cromosoma bacteriano e se limite unicamente a afectar ao ácido nucleico foráneo. Isto é por que a PAM só está presente neste último e non no material xenético da bacteria, xa que non forma parte da secuencia que se integra no proceso de adaptación, senón que está adxacente a ela (25).

O sistema tipo II é o atopado en especies coma o *Streptococcus pyogenes* ou o *Staphylococcus aureus*. A Cas9 ten un tamaño de 1368 aminoácidos (cuxa codificación require aproximadamente 4,2 kb) e presenta unha serie de rexións con distintas funcións. A rexión PI, no extremo carboxiterminal, é aquela que interroga o DNA na busca de PAMs, permitindo o resto de interaccións da molécula. A rexión NUC separa as febras de ADN para enfrontar unha delas ao RNA guía, interrogalas. A carga positiva dos seus aminoácidos atrae cara si unha das febra de ADN rompendo as pontes de hidróxeno que as unen. Se o ADN e o RNA son complementarios, actívanse as rexións de corte: HNH corta a febra diana, e a rexión RuvC-I corta a súa complementaria (que coincide coa secuencia do sgRNA) (Figura 3) (18).

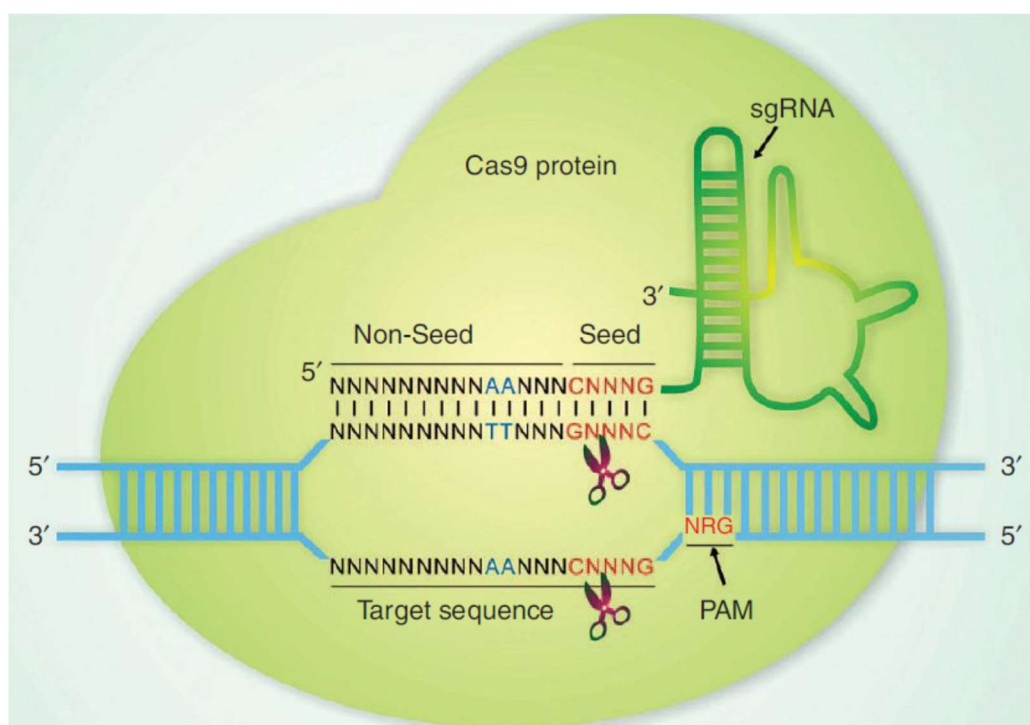


Figura 3: Estrutura de CRISPR-Cas9, o sgRNA coa *seed region* e o bucle de unión a Cas9 (verde) e a PAM na secuencia diana. As tesoiras representan as rexión HNH (superior) e RuvC-I (inferior). Figura obtida de (27).

A utilización de Cas9 como ferramenta de edición xenética precisa en primeiro lugar, a nucleasa Cas9; en segundo lugar, un RNA que sexa por un lado complementario á secuencia que queremos cortar e polo outro conteña a secuencia de unión a Cas9, que chamaremos **sgRNA** (RNA guía sintético); en terceiro lugar, a secuencia a modificar debe comezar por unha **PAM**, xa que se non a interacción entre ADN e Cas9 non será estable, dificultando o corte (Figura 3). Aínda que inicialmente a PAM é unha limitación importante, hoxe coñecemos os aminoácidos da secuencia de Cas9 que condicionan a unión á PAM, polo que se poden deseñar endonucleases modificadas que recoñezan PAMs diferentes (28), e dispoñemos de variedade de moléculas ortólogas de Cas9 procedentes de distintas especies bacterianas, de diferentes tamaños e que recoñecen distintos PAMs (29) (Ver Táboa 1).

Táboa 1: distintas Cas9 e as PAM que recoñecen. Adaptada de (30)

Cas9	PAM	Cas9	PAM
Streptococcus pyogenes (SpCas9)	3' NGG	Staphylococcus aureus (SaCas9)	3' NNGRRT ou NNGRRR(N)
SpCas9 variante D1135E	3' NGG (e NAG reducido)	AsCpf1 e LbCpf1	5' TTTV
SpCas9 variante VRER	3' NGCG	AsCpf1 RR e LbCpf1 RR	5' TYCV
SpCas9 variante EQR	3' NGAG	AsCpf1 RVR	5' TATV
SpCas9 variante VQR	3' NGAN ou NGNG	Campilobacter jejuni	3' NNNNRYAC
xCas9	3' NG, GAA ou GAT	Neisseria meningitidis	3' NNNNGATT
SpCas9-NG	3' NG	Streptococcus thermophilus	3' NNAGAAW

Observouse que, como comentamos con outras endonucleases, cando se emprega CRISPR-Cas9 prodúcense cortes en lugares que non corresponden coa secuencia diana, chamados *off-target*. Estes efectos parecen deberse a que Cas9 ten certo nivel de tolerancia con pequenas diferencias de complementariedade entre o sgRNA e a secuencia diana (28). Isto unido a que a eficiencia da enzima varía para secuencias adxacentes igualmente accesibles, suxire interaccións secundarias entre o ADN diana e certos residuos da proteína que axuden a estabilizar a unión en ausencia de complementariedade perfecta. Pensouse que algunha forma de reducir os efectos *off-target* e aumentar a especificidade podería ser o emprego de *nickases* dobres, de forma análoga aos sistemas das ZFNs e das TALENs. Unha *nickase* (*nicking enzyme*) é unha Cas9 modificada para perder a actividade catalítica en HNH ou en RuvC-I, de xeito que soamente corta unha das cadeas. Obtendo a rotura de dobre cadea a través de dous fenómenos de rotura sinxela independentes reducimos a probabilidade de que este fenómeno se produza fora da secuencia diana. Outra é optimizar a lonxitude dos sgRNAs, para mellorar a especificidade e a eficiencia. O grao de pregamento do ADN e polo tanto o accesible que sexa tamén é un factor que inflúe na actividade e eficiencia (18). Poderíanse facer modificacións de Cas9 para reducir estes efectos, como diminuír a carga positiva da rexión NUC, aínda que isto podería afectar á súa eficiencia (28). Hoxe temos mellor caracterizadas estas interaccións e coñecemos outros factores que poderían estar relacionados, como a estrutura secundaria do sgRNA que empreguemos, a localización no xenoma ou a presenza de rexións hipersensibles á acción da Dnase1 (rexións menos condensadas de ADN) (31). Existen diversas ferramentas informáticas que axudan no deseño de sgRNAs como o E-CRISPR, outras que buscan PAMs

seguidas de secuencias parcial ou completamente complementarias ao noso sgRNA ao longo do xenoma (como CFD) e outras que tratan de integrais con estes outros factores, (como por exemplo Elevation ou CRISTA), estas últimas con mellores resultados para predicir efectos *off-target* (31).

A actividade de CRISPR-Cas9 foi medida en moitos experimentos, e os resultados obtidos foron variables. O principal condicionante desta é o deseño do sgRNA, existindo unha serie de parámetros que é interesante coñecer de cara a optimizar o deseño e a eficiencia do sistema. (31). Dos relacionados coa secuencia, as posicións máis importantes localízanse próximas á PAM a unha distancia de 8-12 nucleótidos, dentro do que se chama *seed region* (Figura 3). Algunhas destas variables son posicións de nucleótidos concretos (por exemplo, o situado na posición 20 do sgRNA, adxacente á PAM, que está involucrado na separación das febras de ADN e na formación do bucle R onde o RNA hibrida co ADN); a proporción de CG na secuencia; estar a secuencia diana preto dunha rexión promotora (posiblemente pola súa maior accesibilidade); a estrutura secundaria do gRNA (se a *seed region* tende a formar estrutura secundaria, aumenta a eficiencia) (32); a presenza de varias secuencias PAM na cadea diana, que é un factor inhibitorio (33); a abundancia de timinas ou a presenza dunha guanina inmediatamente corrente arriba á PAM (31). É importante á hora de avaliar os resultados ter en conta o método co que o midamos, xa que empregando a secuencia de ADN podemos detectar modificacións que non sexan funcionais, e empregando unicamente o fenotipo das células modificadas podemos pasar por alto edicións que sexan silentes pero realmente tivesen lugar. Isto inflúe na efectividade dos modelos informáticos empregados para a predición dos efectos *on-target*, creados con técnicas de *machine learning*, como *Random Forest* e *Support Vector Machines* (31). Actualmente séguese a investigar na predición do comportamento e as interaccións epixenéticas segundo a secuencia do sgRNA, coma o traballo recentemente publicado por Guishan Zhang (34) que combina as máquinas de soporte vectorial con redes neuronais.

Alguns autores describiron que a utilización de CRISPR-Cas9 en certas liñas de precursores hematopoéticos induce a morte celular mediada por activación de p53 nunha porcentaxe importante (80%) das células editadas, comprometendo a eficiencia. Esta activación sería consecuencia da detección das roturas de dobre cadea no ADN. A expansión clonal destas células podería seleccionar positivamente mutantes de p53, aínda que a inhibición transitoria desta vía reduciría o risco. É precisa unha mellor caracterización deste fenómeno e debe terse en conta o risco, debido a que a utilización de células editadas en transplantes de precursores, en caso de xerarse mutantes de p53, podería ter consecuencias perigosas, como a aparición de neoplasias hematolóxicas (35).

A principal vantaxe do sistema CRISPR-Cas9 sobre os outros sistemas é a súa accesibilidade: só é necesario deseñar un sgRNA, en vez do complexo e longo proceso de deseño e validación das TALENs ou ZFNs. Ademais, a densidade de secuencias diana é comparable á das TALENs, igual que a eficacia (que aínda que é superior ás ZFNs, é variable) e a baixa citotoxicidade. Outra vantaxe de CRISPR-Cas9 é que permite a edición de diferentes dianas ao mesmo tempo empregando máis dunha guía (*multiplexed editing*) e mesmo diferentes endonucleases simultaneamente. (15).

Ademais súa función como endonuclease, existen outras tecnoloxías baseadas en CRISPR-Cas9 con diferentes aplicacións: dCas9 é unha Cas9 mutada sen capacidade de cortar o ADN e que pode ser utilizada como plataforma e guía para outras moléculas. Por exemplo, para regular a expresión xénica (CRISPRi e CRISPRa) ou asociando a substancias fluorescentes para marcar

secuencias. A mosamos unha táboa (Táboa 2) con algunhas das diferentes tecnoloxías baseadas en CRISPR.

**Táboa 2: tecnoloxías CRISPR**

Nome	Cas	Moléculas asociadas	Función	Ref
CRISPRa	d-Cas	factores de transcrición	activación dun xene	(1)
CRISPRi	d-Cas	inhibición da RNA-pol	represión dun xene	(1)
CRISPR-X	d-Cas	Citidina-deaminase	xerar diversidade xenética dirixida	(36)
EvolvR	nickase	ADN polimerase IV	xerar diversidade xenética dirixida	(1)
Editor de bases	d-Cas	nucleótido desaminase	cambio de bases	(37)
Cascade	Cas3		deleccións de ata 100kb	(1)
LiveFISH	Cas9/Cas13	oligonucleótidos fluorescentes	visualizar secuencias en vivo e en tempo real	(38)
Transposase asociada a CRISPR	Cas3 ou Cas12	Tnt7-like transposase	insercións	(39)
Prime editing	nickase	Retrotranscriptase	insercións, deleccións e correccións	(40)

### 4.2.3 Ferramentas emerxentes

#### 4.2.3.1 Editores de bases

Malia as súas vantaxes, o sistema CRISPR-Cas9 segue a basearse en roturas de dobre cadea e a corrección das mutacións a través de HDR. Por isto, pode producir microinsercións e deleccións (indels) por activación dos fenómenos de NHEJ, con certa heteroxeneidade nos produtos da edición, o que motiva o deseño de variantes baseadas noutros principios: os editores de bases (*base editing*, *BE*). O BE permite producir mutacións de transición sobre un só nucleótido, cambiando C a T (CBE, APOBEC1) ou A a G (ABE, TadA), e tamén T a C e G a A se a que editamos é a cadea complementaria. Consiste na asociación dunha dCas9 cunha desaminase que actúa sobre a cadea de ADN que non se une ao sgRNA no bucle R. Nesta cadea prodúcese unha pequena fiestra de catro ou cinco pares de bases (variable segundo a proteína usada, pero en torno á posición 6 contando o PAM en 21-23) sobre as que pode actuar a enzima. Aínda que hai diferenzas entre CBE e ABE, presentan impurezas na edición, xeran indels, teñen actividade *off-target*, producen edicións “colaterais” (*bystander edits*, cambios en nucleótidos adxacentes á diana) así como outras limitacións (37).

#### 4.2.3.2 Prime editing

Recentemente describiuse o *prime editing* (PE), que consiste na asociación dunha *nickase* cunha retrotranscriptase empregando como guía e molde un pegRNA (*prime editing guide RNA*) (40). Este RNA posúe, como os outros, dominios complementarios ao ADN diana e dominios de unión a Cas9, pero ademais inclúe unha transcrición a RNA da secuencia que se

pretende editar. Deste xeito, ao cortar unha febra de ADN expónse un extremo 3' a partir do cal se retrotranscribe a información contida no noso pegRNA a ADN cromosómico. Isto deixa dous *flaps*, un 5' coa secuencia orixinal e un 3' coa secuencia editada, dos cales o 5' ten máis probabilidades de ser degradado por enzimas celulares, resultando na incorporación da secuencia modificada. A disparidade entre secuencia editada e salvaxe pode resolverse a favor de calquera das dúas, pero se diriximos unha *nickase* que corte a salvaxe, a célula tenderá a utilizar a editada como molde para reparar a outra e non ao revés. Esta segunda *nickase* deberá ter unha diana diferente á primeira (PE3), ou empregar como tal a secuencia xa modificada (PE3b), para evitar roturas de dobre cadea. O prime editing permite editar SNPs, realizando calquera cambio de base, con menor eficiencia que BE na fiestra de edición, pero maior fora dela. Tamén permite insercións e delecións pequenas, e delecións de gran tamaño, demostrándose como unha ferramenta versátil. Mostra menor actividade nos efectos *off-target* coñecidos da Cas9-sgRNA convencional e unha menor taxa de insercións e delecións indeseables. Permite a elección de diferentes secuencias diana, dianas da *nickase* secundaria, pegRNAs e cal das febras editar, o que leva a dispoñer de diversas posibilidades de optimización (40). Trátase dunha técnica nova e prometedora, pero polo momento só foi empregada *in vitro* en algunhas liñas celulares de laboratorio, polo que require de maior desenvolvemento, sendo a transporte unha das principais dificultades que se presentan (1).

#### 4.2.4 Outras técnicas de edición xenómica

Ademais das endonucleases xa expostas, existen outras ferramentas de edición xenómica anteriormente descritas, e que serán brevemente comentadas. É o caso dos sistemas de recombinases específicas Cre-loxP e Flp-FRT, que proveñen do bacteriófago P1 e de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Trátase de enzimas da clase tirosina kinase capaces de recoñecer secuencias de nucleótidos no ADN (os loci loxP e FRT) e catalizar un intercambio entre ambas cadeas. Se as dúas secuencias se atopan nunha mesma cadea pode conseguirse a exclusión da secuencia que se atopa no medio, sendo unha ferramenta útil para xerar KOs. Unha das principais desvantaxe é que as recombinacións son reversibles, polo que se desenvolveu un terceiro sistema, a  $\Phi$ C31, que só recombina nunha dirección. Estas ferramentas foron empregadas en animais e células humanas para modelar enfermidades, desenvolvéndose técnicas para obter especificidade de tecido, KOs inducibles (tetraciclinas e tamoxifeno), ou as trampas xénicas (*gene trapping*), baseadas na inversión da secuencia, invalidando a súa función de xeito reversible. Estas técnicas están limitadas porque soamente poden actuar sobre os lugares que recoñecen, ademais de que producen altas taxas de letalidade nas células (41).

As nanopartículas de PNA son análogos de ácidos nucleicos estruturadas en esqueletos peptídicos que lles confiren resistencia á degradación. Poden recoñecer secuencias concretas e invadilas formando distintas estruturas segundo o tipo de PNA (*bis-PNA*, *tail clamp (tcPNA)*, *pseudo complementary (pcPNA)*, e *gammaPNA*). O seu mecanismo de acción está baseado na indución da reparación do ADN mediante escisión de nucleótidos (NER), reparando o mutante grazas a unha secuencia homóloga. Poden ser transportadas ao interior das células acompañadas por distintas partículas, como os CPPs e outros vectores químicos. Ofrecen a vantaxe de evitar as roturas de dobre cadea das endonucleases, sendo en principio máis seguras, pero a súa eficiencia é da orde de 0'5 a 5%. Foron empregadas para corrixir mutacións patóxenas en liñas celulares hematopoiéticas humanas (42).

### 4.3 O TRANSPORTE NOS SISTEMAS DE EDICIÓN

A edición do ADN dunha célula mediante CRISPR-Cas9, ou calquera outro método, require de que transportemos certas moléculas ao seu interior. O proceso de transporte adoita conceptuarse con dous elementos: a carga e o medio de transporte. A carga pode ser un fragmento de ADN que codifique Cas9 e o sgRNA, mRNA para traducilo a Cas9 e sgRNA ou ben a proteína Cas9 directamente co sgRNA (ribonucleoproteína, ou RNP). Con este último método, se ben non logramos unha expresión duradeira de Cas9 que pode ser desexable en algúns casos, podemos controlar mellor a cantidade de Cas9 que hai na célula nun momento dado reducindo os efectos *off-target*. Os medios de transporte podemos clasificalos en tres grandes grupos segundo a súa natureza: medios físicos, químicos e biolóxicos (vectores virais e vectores non virais) (43). Neste traballo farase unha distinción entre os métodos de aplicación física e química, de uso *in vitro* ou *ex vivo*, e os métodos con vectores, que ademais diso poden ser empregados tamén *in vivo*.

#### 4.3.1 Métodos físicos

Dentro dos métodos empregados *in vitro* destaca a microinxección, un método físico considerado *gold standard*. A microinxección permite evitar barreiras ao transporte como pode ser a matriz extracelular, non está limitada polo peso molecular da carga e permite o control das cantidades introducidas. Pero ten limitacións, xa que as células unicamente adoitan tolerar unha soa inxección, e é un proceso laborioso e complexo. Habitualmente faise unha inxección citoplasmática de mRNA de Cas9 e dos sgRNA, o que permite unha expresión da molécula ata que o mRNA se degrada no citoplasma. Isto permite que se produzan menos efectos adversos que coa inxección intranuclear de ADN, que da lugar a unha expresión de Cas9 máis duradeira e menos controlada, con maior probabilidade de efectos *off-target* (43).

A electroporación é outro método frecuente, baseado na utilización de pulsos eléctricos de alto voltaxe para abrir canais nanométricos a través da membrana celular polos que poden entrar os compoñentes ao citoplasma. Emprégase en cubetas ou cámaras específicas, nas que as células se atopan bañadas nun medio onde están presentes as moléculas que desexamos transportar (43). Aínda que tamén está descrito o seu uso en embrións de rato intra-útero, non é habitual que se empregue desta forma (44).

#### 4.3.2 Métodos químicos

O fosfato cálcico é un medio químico que forma complexos ADN-Ca<sup>2+</sup> que precipitan, únense a cargas negativas da membrana e inducen endocitose. O FuGENE-6 é outro método químico, unha solución comercial con lípidos non liposomais entre outros compoñentes, empregada para transportar secuencias xénicas ao interior das células. Os CPPs son pequenas cadeas de aminoácidos con características de polaridade variables, que permiten recubrir diferentes moléculas e introducilas en distintos tipos celulares, segundo o deseño de CPP empregado (43).

Os nobelos de ADN (*DNA nanoclews*) son unha nova tecnoloxía deseñada para transportar CRISPR-Cas9 ao interior da célula. Consiste en estruturas formadas por este ácido nucleico que se autoensamblan en formas esféricas, por estaren formadas por secuencias palindrómicas, quedando ocas no interior. Poden transportar unha carga e, baixo certas condicións biolóxicas, por exemplo o pH, cambiar de conformación e liberalas. Resultan altamente eficaces e poden

ser empregadas en combinación con outros métodos, como por exemplo a polietilenimina (PEI) un polímero que permite amortecer o pH dos endosomas, facilitando o escape das moléculas transportadas (43,45). Ningún destes métodos químicos se emprega *in vivo*.

### 4.3.3 Vectores virais e non virais, transporte *in vivo*

#### 4.3.3.1 Vectores virais

Os vectores virais baséanse na utilización do virus, que aporta especificidade de tecido e a capacidade de atravesar a membrana plasmática, como contedor para a carga desexada, podendo ser usados tanto *in vitro* coma *in vivo*. Empréganse tres familias, os AAV (asociados a adenovirus), os LV (lentivirus) e os AdV (adenovirus). AAV non integra o material xenético no ADN da célula senón que se mantén independente do cromosoma, reducindo o risco de que se produzan aberracións xenéticas no proceso de integración. AdV integra no xenoma, así como LV, o cal ten unha alta eficacia, ocasionando unha expresión máis prolongada pero incontrolada e que comporta o risco de mutacións potencialmente perigosas. Existen variantes de LV que non integran, pero perden a súa maior eficacia. Segundo o efecto desexado pode escollerse un ou outro vehículo: a expresión mantida de Cas9 leva a unha maior efectividade, pero a costa de aumentar os efectos *off-target*, e non sempre tería por que ser desexable. Os máis axeitados para a utilización terapéutica *in vivo* semellan ser os AAVs (1,43,45).

Os AAV son virus ADN de cadea única, versátiles en canto a serotipo e especificidade e provocan pouca resposta inmune, non sendo patóxenos humanos coñecidos. O maior problema radica na capacidade da partícula viral, que ten pouca máis capacidade que o ADN imprescindible para Cas9 e o sgRNA, o que deixa pouca marxe para introducir outros elementos para optimizar o proceso. Para solucionalo intentouse optimizar o pregamento do ADN, editar as células previamente para expresar Cas9 por outro método empregando o virus para transportar so sgRNA, coinfectar as células con dúas partículas distintas ou buscar alternativas con outras Cas9 ortólogas máis pequenas. Os lentivirus e adenovirus (LV e AdV) úsanse de forma semellante. AdV está amplamente estudado, e presenta múltiples serotipos con distintos tropismos entre os que podemos escoller o máis axeitado, pero resulta significativamente inmunoxénico, o que non o fai axeitado para o seu uso *in vivo*. LV pode ser pseudotipado con partículas doutros virus, obtendo especificidade tisular. A principal vantaxe respecto aos AAV é o maior tamaño, en vez de 20 nm, 80 a 100 nm, permitindo o transporte de moita máis carga (43,45).

Un problema que presenta a utilización *in vivo* de CRISPR-Cas9 é a resposta inmune do suxeito. Por unha parte, especialmente co uso de vectores virais, podemos obter unha resposta inmune contra o medio de transporte. Como exemplo, coñécese que os AdV son altamente inmunoxénicos e están descritos casos de inflamacións agudas dos órganos editados en animais de experimentación (46), coma se dun rexeitamento de transplante se tratase. Estes problemas redúcense empregando vectores non virais, como se expón a continuación. Ademais, aínda que o seu impacto sobre a eficacia clínica aínda non se coñece, demostrouse a presenza na poboación de anticorpos contra Cas9 (47,48), o que podería provocar respostas fronte ás células editadas. Nestes estudos tamén se demostrou a presenza de Treg reactivas á Cas9, que poderían mitigar unha hipotética reacción contra as células modificadas sen necesidade de que se tivese que tratar aos pacientes con fármacos inmunosupresores, que serían unha alternativa. Algúns ortólogos de Cas9 son máis inmunoxénicos que outros, por exemplo, a Cas9 de *S. aureus* máis

que a de *S. pyogenes*. Con todo, este fenómeno sería de menor importancia en casos de edición *ex vivo*, como as aplicacións sobre CAR-T ou sobre proxenitores hematopoéticos.

#### 4.3.3.2 Vectores non virais

Coa principal vantaxe fronte aos vectores virais de produciren unha resposta inmune moito menor, os vectores non virais son unha alternativa moi interesante á hora de explorar o transporte de CRISPR-Cas9. As partículas liposomais permiten o transporte de ADN e RNPs, e poden ser decoradas con diferentes moléculas na súa membrana que permitan especificidade na diana, evitar máis eficazmente a resposta inmune e non ser degradadas nos lisosomas celulares unha vez atravesan a membrana plasmática. Estes procedementos teñen boa eficiencia, pero presenta inconvenientes como a toxicidade das partículas ou efectos sobre células distintas do tecido diana (1,43).

Os amino-lípidos zwitterionicos (ZAL) están formados por unha cabeza lipídica cunha rexión intermedia rica en amina. Os mRNAs necesarios para codificar CRISPR-Cas9 únense á estrutura a través de colas hidrofóbicas, e os ZAL transpórtanos a través da membrana (45).

As nanopartículas de ouro (AuNP) poden ser conxugadas con ADN tiolado (con grupos de xofre) ou cadeas de aminoácidos (arxinina e glutamato) para á súa vez transportar RNPs de Cas9 e sgRNA no interior das células. As vantaxes que ofrecen as nanopartículas de ouro son unha elevada eficiencia e o feito de que sexan inertes e non desencadeen resposta inmune. Foron empregadas con ADN tiolado (CRISPR-Gold) para a corrección de mutacións en *Dmd* en ratos e para o knock-down do *Grm5* (síndrome X fráxil), e estase a estudar o transporte en células endoteliais para acceder a outros órganos, como os pulmóns, polo que resultan un método prometedor (1,45).

Finalmente, comentar o transporte hidrodinámico. Trátase da inxección da carga desexada cun gran volume de líquido no torrente vascular do individuo, de xeito que aumente bruscamente a presión hidrostática intravascular, co que a carga entra nas células circundantes impulsada pola diferenza de presión. É un método de baixa eficiencia e só permite acceder ao endotelio ou órganos moi vascularizados como o fígado, pero pode resultar de utilidade en enfermidades onde a edición supoña unha selección positiva das células corrixidas. Resulta un método atractivo pola súa sinxeleza, que permite a administración *in vivo* sen necesidade de empregar vectores, aínda que pode ter repercusións sobre a estabilidade hemodinámica do suxeito (43,49). Foi empregado *ex vivo* sobre segmentos de fígado para transplante en seres humanos, administrando a infusión cun catéter na vena hepática (50), e pode aplicarse sobre músculo esquelético nunha extremidade mediante o uso de torniquetes (51).

#### 4.4 APLICACIÓNS PRECLÍNICAS

Estas ferramentas poden utilizarse para a investigación básica, facer modelos de enfermidades, desenvolver fármacos ou con fins terapéuticos. Para iso, poden empregarse sobre modelos celulares e seres humanos, pasando por organismos e modelos organoides. A continuación, expoñeremos brevemente distintos modelos para centramos máis adiante nos usos terapéuticos da edición xenética.

As liñas celulares son un elemento fundamental en investigación básica ou desenvolvemento de novos fármacos. Células de pacientes con enfermidades concretas supoñen un modelo básico de dita enfermidade, e quizais o exemplo paradigmático sexan as liñas de células cancerixenas (52). As iPSCs son células somáticas diferenciadas sometidas a un proceso polo cal recuperan a súa pluripotencialidade, de xeito que poden reproducirse e rediferenciarse, e son modelos útiles en multitude de enfermidades, dende hematolóxicas (53) ou cardiovasculares(54), a hepáticas (55) ou neurolóxicas (56) por citar algúns exemplos.

Os organoides son estruturas tridimensionais obtidas mediante o cultivo de células nai diferenciándoas nunha estrutura análoga á do órgano que simulan. Por exemplo, un modelo intestinal contén unha capa de epitelio cos distintos tipos celulares intestinais e cunha arquitectura en criptas e *villi*. Presentan unha serie de vantaxes fronte aos cultivos, como a estrutura tridimensional, a maior semellanza no ambiente ao órgano real, o teren un desenvolvemento máis estable, ou mesmo reducir os efectos *off-target* do sistema CRISPR-Cas9 en comparación cos cultivos. Entre outras, teñen aplicacións en descubrimento de fármacos e estudo da enfermidade inflamatoria intestinal, cancro ou fibrose quística (57).

Os estudos en organismos permiten un enfoque diferente, permitíndonos comprender mellor o mecanismo e as interaccións entre xenes nas enfermidades xenéticas. Son modelos habituais a *Saccharomyces cerevisiae*, pola súa capacidade de medrar en estado haploide e diploide; *Caenorhabditis elegans*, pluricelular e cun sistema nervioso moi simple; *Drosophila*, coa que xa temos unha maior proporción de xenes ortólogos, ou o peixe cebrá, que proporciona unha alta complexidade xenética semellante á nosa, e máis facilidades que os modelos con mamíferos, que tamén se empregan. Este último en concreto, o peixe cebrá, é empregado en múltiples traballos para o estudo do cancro, trastornos da conducta e do desenvolvemento ou do metabolismo por citar algúns (58). Os modelos murinos son uns dos máis empregados entre os mamíferos, aínda que tamén se empregan outros coma cánidos ou primates. Poden ser humanizados, ratos inmunodeprimidos que aloxan células ou tecidos humanos, e empregados para estudar diferentes enfermidades infecciosas, metabólicas, neoplasias ou para investigar novos fármacos (59).

## 5. Terapia xénica

A terapia xénica consiste en facer chegar a unha poboación celular diana unha secuencia de material xenético para que regule, elimine, repare, engada ou substitúa un produto xénico desa célula que causa unha patoloxía. Dito material xenético pode ser de diversas características, dende unha secuencia que codifique unha proteína, ata un oligonucleótido anti-sentido ou un RNA de interferencia, pasando por un sistema de edición xenómica como CRISPR-Cas9. Para isto, é necesario vehicular dito material ata o interior da célula, podendo empregarse métodos físico-químicos, vectores virais e vectores non virais, como xa se expuxo (60).

Neste apartado repasaranse as terapias xénicas aprobadas ata a actualidade pola EMA e a FDA, analizarase a investigación coas mesmas en enfermidades de especial relevancia e veranse os principais ensaios clínicos en fases avanzadas que se están a levar a cabo. Finalmente abordarase máis polo miúdo o papel da edición xenética e de CRISPR-Cas9 neste tipo de terapias. As células CAR T e os virus oncolíticos, que tamén se poden incluír dentro do concepto de terapia xénica, serán desenvolvidos nun apartado específico dentro da inmunoterapia.

### 5.1 ESTRATEXIAS E FÁRMACOS APROBADOS

Un oligonucleótido anti sentido (ASO) é unha cadea curta de ADN ou RNA con especificidade por un transcrito, cuxa unión pode desencadear a degradación de dito RNA ou, en mRNA inmaturo, alterar o proceso de *splicing*. Deste xeito, con eles podemos silenciar un xene ou excluír un exón mutado permitindo a síntese dunha proteína máis curta pero funcional (6,60).

Fomivirsen era un ASO empregado para o tratamento da retinite por citomegalovirus (CMV) en infectados polo VIH. O CMV é un patóxeno oportunista causante de infección en pacientes con recontos baixos de CD4, e se o paciente non recibe tratamento evoluciona progresivamente chegando a causar cegueira. Fomivirsen é complementario ao mRNA que codifica a IE2, proteína do virus indispensable para a replicación. Hoxe os fármacos de uso habitual nesta patoloxía son o valganciclovir e o foscarnet, e fomivirsen, que era empregado como seguinte liña de tratamento, xa non está comercializado. Coa mellora dos tratamentos antirretrovirais para o VIH, esta infección xa non é tan común como foi noutro tempo (60).

Kynamro, nome comercial do mipomersen, é un ASO aprobado pola FDA para o tratamento da hipercolesterolemia familiar homocigota. Estes pacientes, na súa maioría por mutacións no receptor de LDL, non poden internalizar as partículas de LDL nas células, aumentando considerablemente a súa concentración en sangue (ata máis de 500 mg/dl) e causando aterosclerose prematura e grave. O fármaco bloquea a expresión da apolipoproteína B, necesaria para a síntese de VLDL, e consegue descender os niveis de LDL e de colesterol non-HDL en torno a un 30 % (aproximadamente 100mg/dl), sen afectar aos niveis de HDL. Pode ser combinado con outros tratamentos como a aférese, reducindo as necesidades da

mesma, e é aplicable a máis pacientes que os inhibidores da PCKS9, que non son útiles se a actividade do LDLR é menor do 2%. Con todo, nos estudos a taxa de permanencia no tratamento a longo prazo foi moi baixa, en parte por mor de efectos adversos, fundamentalmente esteatose hepática, cuxa evolución non se puido demostrar como benigna. Ademais, non probou clara eficacia na diminución do risco cardiovascular a longo prazo, quizais pola toxicidade hepática ou por reactividade inmunolóxica que tamén foi descrita. Por estes motivos, a EMA non lle concedeu a súa aprobación e non é un fármaco dispoñible en Europa (61,62).

O xene DMD, situado no brazo curto do cromosoma X, codifica cos seus máis de dous millóns de pares de bases e 89 exóns a distrofina, proteína estrutural das células musculares. A distrofia muscular de Duchenne prodúcese cando unha mutación neste xen, xeralmente un desprazamento do marco de lectura, ocasiona unha perda importante da función. A distrofia de Becker é unha forma máis benigna de enfermidade que acontece cando a perda funcional non é tan grande. Evitando a transcrición do exón mutado evítase o desprazamento do marco de lectura, e prodúcese unha proteína máis curta, pero máis funcional, convertendo unha distrofia severa de Duchenne nunha de Becker. A maioría das mutacións concéntranse entre os exóns 45 e 55, sendo o 51 o que concentra maior proporción delas, o 14%. Eteplirsén é un ASO que altera o *splicing* e evita a transcrición do exón 51. En estudos preliminares demostrou aumentar a produción de distrofina acurtada en algúns pacientes, mais non se conseguiu probar que se traducise nun beneficio clínico ao non ser concluíntes os datos sobre a eficacia, segundo a EMA. Por isto e por dispoñerse de poucos datos sobre a súa seguridade, o fármaco non está comercializado en Europa, pero si nos Estados Unidos (63–65). Recentemente a FDA aprobou o uso en distrofia muscular de Duchenne do golodirsén, un ASO que exclúe o exón 53, en vez do 51 do eteplirsén. Demostrou aumento de distrofina en ensaios de fase I e II, sen efectos adversos graves polo momento (cefalea, pirexia, gastrointestinais) (66).

Actualmente temos constancia de estarse a levar a cabo con Eteplirsén un ensaio fase III en Canadá (NCT03992430), dous en fase II en Europa (NCT03985878, NCT03218995) e un en Estados Unidos en fase II con eteplirsén e golodirsén (NCT04179409). Con golodirsén estanse a levar a cabo ensaios en fase III (NCT03532542, NCT02500381) para avaliar a súa eficacia.

Nusinersén (Spinraza) é un ASO de 18 nucleótidos de lonxitude complementarios a unha rexión reguladora do *splicing* do intrón 7 do xen *SMN2*. Ao interactuar con ela fai que se exprese o exón 7 deste xen, normalmente silenciado, producindo unha proteína SMN funcional, que substitúe á proteína asociada a RNA defectuosa que codifica o xene *SMN1* e que causa a atrofia muscular espiñal. Esta enfermidade de herdanza autosómica recesiva está producida por un defecto na axonoxénese, relacionada coa produción de microtúbulos, o transcrito de miRNA183 e a vía mTor, nas neuronas da hasta frontal da médula ocasionando un déficit motor. Clinicamente presenta diversas formas, e distínguense catro tipos de atrofia muscular espiñal: o tipo 1 é o máis frecuente e grave, maniféstase nos primeiros seis meses de vida en lactantes que non acadan fitos básicos como o sostén da cabeza ou a sedestación, e falecen en torno aos dous anos por complicacións respiratorias. Os tipo 2 e 3 comezan en nenos máis maiores e diferéncianse segundo chegan a andar ou non, representando distintas esperanzas de vida. O tipo catro, finalmente, comeza clinicamente na idade adulta, sendo a forma máis benigna pero tamén máis infrecuente. A forma clínica de presentación está relacionada co número de copias

que presente o suxeito do xene *SMN2*, que oscilan de 2 (formas graves) a 4 ou máis (formas leves). O nusinersen está aprobado pola FDA e a EMA, emprégase en inxección intratecal, xa que non atravesa a barreira hematoencefálica, de 12 mg e require de varias doses de carga iniciais con mantemento cada catro meses (67,68).

Nunha revisión sistemática recente (69) atopáronse catro ensaios feitos con este fármaco. En todos eles os resultados foron positivos tanto para recuperación de forza (escalas clínicas) como para supervivencia, ademais de atoparse diminución das necesidades de ventilación mecánica en comparación con cohorte histórica nun estudo. Con todo, existen posibles nesgos de selección e observación, así como posible heteroxeneidade coas poboacións das cohortes históricas, o que pode nesgar a comparación, e tamén entre os estudos, non sendo axeitados para metaanálise. Por isto, pode que os resultados destes estudos non sexan representativos dos que se obterían no tratamento da poboación xeral con atrofia muscular espiñal. En canto á seguridade, todos os efectos adversos atopados tiñan relación coa evolución da enfermidade ou coa punción lumbar, se ben as poboacións dos estudos son pequenas.

Actualmente están activos cinco ensaios clínicos con nusinersen, dous deles en fase III, un para participantes en estudos previos e outro para probar doses maiores (NCT02594124 e NCT04089566 respectivamente). Un ensaio en fase II pretende avaliar o inicio do tratamento en nenos asintomáticos e estudar a mortalidade e a necesidade de ventilación a longo prazo (NCT02386553). Outro estudo en fase I pretende avaliar o impacto sobre a función respiratoria do tratamento (NCT04050852). Finalmente, atopouse rexistrado un estudo de vixilancia post-comercialización na República de Corea (NCT04317794) Ademais, na busca apareceron outros protocolos pertencentes a cohortes observacionais de adultos a tratamento con nusinersen (NCT03878030, NCT03709784, NCT04159987).

Outra estratexia para o tratamento da AME é a introdución dunha copia do xene *SMN1* nas células nerviosas do suxeito, para que exprese a proteína de forma normal. Zolgensma é o nome comercial do onasemnogene abeparvovec, un fármaco composto por unha copia do xene *SMN* dirixido por un promotor quimérico. Está vehiculado nun AAV9 sen capacidade replicativa, un serotipo de AAV con tropismo polo sistema nervioso central. Atravesa a barreira hematoencefálica, polo que pode ser administrado por vía intratecal e intravenosa, e só require dunha dose de tratamento. Estudos sobre mostras de pacientes falecidos tratados demostraron a expresión de proteína SMN non mutada en diversos tecidos do organismo, incluíndo motoneuronas espiñais e cerebrais. O primeiro ensaio, START, feito para demostrar a seguridade do fármaco, atopou grandes melloras na supervivencia ou dependencia de ventilación mecánica en comparación con cohortes históricas. Tamén se atopou melloría en escalas clínicas (CHOP-INTEND) e en fitos do desenvolvemento motor, chegando un 92% de pacientes a controlar o movemento da cabeza e un 17% a gatear ao final do período de seguimento. STRIVE é un estudo en fase III que se está a levar a cabo para valorar a eficacia, e cuxos datos preliminares corroboran os achados de START. O principal efecto adverso é a elevación de transaminases de ata 15-30 veces por enriba dos valores normais, polo que se incluíu a administración de glucocorticoides no protocolo de tratamento, conseguindo controlar o efecto adverso. Tamén son relativamente comúns os vómitos (6'8%). Outros ensaios están a probar o fármaco en pacientes con EMA tipo 2, e en bebés aínda asintomáticos, xa que o estudo START orientaba a que os pacientes que recibían máis precozmente o tratamento conseguían mellores resultados, así como ensaios en fase III e de seguimento a longo prazo (NCT03381729, NCT03505099, NCT03837184, NCT03306277, NCT03461289, NCT03421977). Ademais destes estudos, na data de redacción deste traballo estábanse a levar a cabo un ensaio en fase

IV de seguimento a longo prazo dos pacientes tratados (NCT04042025). O fármaco está actualmente aprobado pola FDA, e a EMA emitiu un informe de autorización inicial o 27 de marzo deste mesmo 2020 (70,71).

A inmunodeficiencia combinada severa asociada a déficit de ADA é unha enfermidade grave, que adoita resultar letal nos primeiros anos de vida con fracaso no desenvolvemento e infeccións oportunistas recorrentes. O déficit desta enzima bloquea a síntese de ADN ao alterar o metabolismo da adenosina, causando deficiencia no desenvolvemento e función do tecido linfoide, pero tamén afectando a outros órganos (esqueleto, riles, fígado, pulmóns...). A terapia de substitución enzimática é unha opción terapéutica que mellora a función do sistema inmune así como de outros órganos, pero que presentou problemas de seguridade a longo prazo. Hoxe, recoméndase o seu uso como terapia ponte a outros tratamentos, por un período non superior a 5-8 anos (72). Estes tratamentos definitivos serían como primeira opción, o transplante de proxenitores, coa limitación de dispoñibilidade: menos do 25% de pacientes dispoñen de doante cun HLA compatible. A alternativa de tratamento con terapia xénica para pacientes sen acceso a transplante comezou a propoñerse na década de 1990, e os primeiros ensaios comezaron nos anos 2000. Strimvelis foi aprobado en 2016, despois de analizar os datos deses primeiros estudos (73). Trátase dun produto celular de precursores hematopoéticos CD34 + do propio paciente transducidos cun vector retroviral coa secuencia para expresar a ADA humana. Tamén existen alternativas en experimentación que empregan vectores lentivirais (NCT02999984). Os precursores son extraídos e transducidos en laboratorio mentres o paciente recibe un ciclo de acondicionamento con busulfán, debendo permanecer en illamento ata a recuperación do recuento de células T. Os efectos adversos que máis frecuentemente se presentan son a pirexia, citopenias, fenómenos autoinmunes e o síndrome de reconstitución inmune. Na actualidade esta terapia só se leva a cabo no hospital San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy de Milán, onde se están a levar a cabo dous ensaios con este fármaco (NCT03478670, NCT03232203).

A transtirretina (TTR, cromosoma 18) é unha proteína homotetramérica transportadora de RBP e tiroxina que se atopa en sangue e líquido cefalorraquídeo. Certas mutacións no TTR (substitución V30M frecuentemente) causan un cadro de amiloidose hereditaria de carácter dominante, por acumulación de transtirretina nos tecidos, en forma de substancia amiloide. Tipicamente estes pacientes presentan polineuropatía (debut no tipo I) con insuficiencia autonómica, síndrome do túnel carpiano (debut no tipo II), cardiomiopatía e insuficiencia renal, síntomas gastrointestinais e opacidades no humor vítreo. Se ben a presentación, penetrancia e expresividade son variables, a enfermidade tende a comezar a dar clínica en adultos novos, en torno á terceira e cuarta décadas da vida. Tafamidis e diflunisal son moléculas pequenas que aumentan a estabilidade da proteína circulante e enlentece a progresión da enfermidade. Inotersen é un ASO que bloquea a expresión do TTR, tanto mutado coma salvaxe, que demostrou frear ou mellorar a polineuropatía asociada á enfermidade fronte a placebo de xeito global e por subgrupos de pacientes en distintas fases da enfermidade (74). En canto a efectos adversos perigosos, rexistráronse tres casos de trombocitopenia (menos de 25000 plaquetas/ml) e tres de glomerulonefrite sobre un total de 112 pacientes tratados co fármaco, dos cales catro faleceron po progresión da enfermidade e un por unha hemorraxia intracraneal asociada á trombocitopenia. Inotersen adminístrase por vía subcutánea semanalmente e está aprobado pola FDA e pola EMA para o tratamento da amiloidose familiar por TTR en estadio 1 e 2 (75,76).

Atopáronse tres estudos en desenvolvemento con inotersen como fármaco principal, un deles observacional para avaliar a súa seguridade durante o embarazo (NCT04270058). Outro deles é un ensaio en fase II para avaliar a seguridade e eficacia en pacientes con cardiomiopatía amiloide por TTR (NCT03702829). O terceiro, un ensaio en fase III aleatorizando sen enmascaramento empregando o inotersen como grupo de comparación para unha nova molécula (ION-682884), baseada en RNA (NCT04136184).

Os siRNA (RNA de interferencia pequeno) son moléculas de dobre cadea de RNA de 21-23 nucleótidos que ao resultar complementarios a un mRNA inducen a súa degradación a través do complexo RISC, bloqueando a expresión do xen. Existe un fármaco baseado neste principio que emprega partículas lipídicas como vector e que se emprega para o tratamento da amiloidose familiar por TTR, o patisirán (Onpattro). Demostrou eficacia fronte a placebo en distintos ensaios, con mellora na calidade de vida, neuropatía e diminución dos eventos asociados á enfermidade, con efectos adversos relacionados coa inxección e casos de bloqueo aurículo-ventricular. Foi aprobado por primeira vez en 2018, case en paralelo ao inotersen, e empréganse ambos, non existindo polo momento estudos que os comparen (77). Atopouse un estudo dunha cohorte prospectiva que analizaba a evolución de pacientes tratados cos dous medicamentos que está en fase de recrutamento de pacientes (NCT03431896).

As betahemoglobinopatías son enfermidades xenéticas por mutacións no xene *HBB*, que codifica a forma máis común de hemoglobina no adulto. A talasemia maior é causada por un déficit ou ausencia de síntese da cadea beta en homocigose, dando clínica dende a infancia cunha anemia microcítica e hipocrómica grave que require transfusións periódicas. Estas transfusións a longo prazo causan sobrecarga de ferro coa consecuent toxicidade cardíaca, hepática e endocrina e condicionan o pronóstico (78). A drepanocitose ou anemia falciforme prodúcese por mutacións que ocasionan que a cadea beta forme agregados, precipite, e deforme os hematíes na característica forma de fouce. A clínica é variable, podendo comezar a partir dos tres meses de vida, e consistindo en infartos periféricos (característicos os infartos esplénicos) e infeccións atípicas, que a longo prazo poden causar a morte. A clínica só se produce en homocigose (herdanza recesiva), xa que en heterocigose constitúe un trazo protector fronte á malaria (79).

Para os pacientes con talasemia a opción de tratamento é o transplante de proxenitores que non posúan esta mutación e sexan capaces de producir hematíes sans. Debido a que a dispoñibilidade de doantes compatibles é unha limitación, e os transplantes aloxénicos poden producir complicacións importantes, a terapia xénica ofrece unha alternativa para estes pacientes. Zynteglo consiste en células CD34+ autólogas do paciente transducidas cun vector lentiviral co que se introduce unha copia do xene *HBB* coas que se fai un transplante autólogo ao paciente. Introducendo unha substitución nun aminoácido (T87Q) conseguimos inhibir a polimerización patolóxica da hemoglobina, servindo de tratamento para a anemia falciforme. Este tratamento foi probado con pacientes en ensaios, demostrando un bo perfil de seguridade, con efectos adversos relacionados co acondicionamento con busulfán, e unha boa eficacia: a metade dos pacientes, cun fenotipo menos grave (non  $\beta^0/\beta^0$ ), conseguiron independencia das transfusións, e o resto conseguiron unha redución relevante do volume de transfusións anuais así como aumento dos niveis de hemoglobina, en relación coa eficiencia da transdución e o éxito do enxerto. É preciso continuar o seguimento, para avaliar o tempo que se mantén a

resposta ao tratamento e a posible aparición de efectos adversos a longo prazo (80). O uso de Zynteglo está aprobado pola EMA dende maio de 2019 para pacientes con talasemia dependentes de transfusións e que non teñen un fenotipo  $\beta^0/\beta^0$ . Actualmente existen 5 ensaios activos con terapia xénica con vectores virais para o tratamento da talasemia (NCT03351829, NCT03276455, NCT02453477, NCT02906202, NCT03207009) ademais de estudos de seguimento a longo prazo.

O xene *RPE65* codifica para unha isomerase do retinol que participa no ciclo visual. Mutacións nel poden producir unha disfunción na proteína que causa unha distrofia de retina grave de inicio na infancia temperá. Caracterízase por cegueira nocturna grave conxénita, nistagmo, unha agudeza visual reducida ( $<0,3$ ) e distrofia de retina progresiva. Existe unha superposición coa amaurose conxénita de Leber (81). Para o tratamento destes pacientes dispoñemos de Luxturna (voretigén neparvovec), un fármaco composto por unha copia do xene *RPE65* vehiculizado nun AAV2. Debe administrarse por vía intraocular, nun quiórfano, sobre retina viable, e combinado con tratamento con prednisolona, e cun tempo de polo menos 6 días entre ambos ollos (82). Demostrou eficacia cun mantemento do efecto de catro anos, ata o fin do período de observación do estudo, e cun perfil de seguridade correspondente á intervención cirúrxica necesaria para a administración (83). Actualmente constan datos de cinco ensaios con este fármaco, dous en amaurose conxénita de Leber (NCT00516477, NCT01208389) dous en distrofia de retina grave de inicio na infancia temperá asociada a mutacións de *RPE65* (NCT03597399, NCT03602820) e un con ambas patoloxías (NCT00999609).

Un aptámero é unha cadea solitaria de RNA ou ADN de uns 15-80 nucleótidos con capacidade para pregarse sobre si mesma en estruturas tridimensionais, grazas á que ten a capacidade de interactuar selectivamente con outras moléculas, comportándose de forma análoga aos anticorpos. Teñen múltiples usos en biotecnoloxía, sendo pegaptanib un fármaco desta natureza aprobado para a dexeneración macular asociada á idade (DMAE). O fármaco, de administración intravítrea, ten actividade antianxioxénica ao estar dirixido contra o VEGF, e inhibe a proliferación vascular propia da forma húmida desta enfermidade. Aínda que demostrou efectividade fronte a placebo cun bo perfil de seguridade, actualmente está desprazado por outros antianxioxénicos como ranibizumab e bevacizumab, con mellores resultados, aínda que non hai ensaios que os comparen directamente (84). Actualmente estase a explorar o seu uso transportado por nanoestruturas de ADN como posible estratexia de tratamento para o cancro (85).

A continuación axuntamos unha táboa que resume os fármacos tratados ata o de agora. (Táboa 3).

Táboa 3: resumo dos fármacos aprobados para terapia xénica, alén da inmunoterapia

Fármaco	Categoría	Estado	Patoloxía	Aprobación
Fomivirsén	ASO	en desuso	retinite por CMV	1998
Mipomersén	ASO	só aprobado en EEUU	hipercolesterolemia familiar	2013
Eteplirsén	ASO	só aprobado en EEUU	distrofia muscular de Duchenne	2016
Golodirsén	ASO	só aprobado en EEUU	distrofia muscular de Duchenne	2020
Nusinersén	ASO	en uso	atrofia muscular espiñal	2016
Inotersén	ASO	en uso	amiloidose familiar por TTR	2018
Zolgensma	AAV	en uso	atrofia muscular espiñal	2019
Luxturna	AAV	en uso	amaurose conxénita de Leber	2017
Strimvelis	proxenitores hematopoéticos	en uso	inmunodeficiencia combinada severa	2016
Zynteglo	proxenitores hematopoéticos	en uso	talasemia <i>major</i>	2019
Patisiran	siRNA	en uso	amiloidose familiar por TTR	2018
Pegaptanib	aptámero	en desuso	DMAE	2004

## 5.2 EDICIÓN XENÉTICA EN TERAPIA XÉNICA

A edición xenética proporciona a posibilidade de facer cambios dirixidos e precisos no xenoma, permitindo intervencións duradeiras, sen necesidade de repetir a terapia como no caso dos ASOs. A terapia xénica pode facerse *in vivo*, para o que é necesario un vehículo que transporte o noso sistema de edición, ou *ex vivo*, en laboratorio sobre células do paciente que posteriormente lle inoculamos. A aplicación paradigmática da terapéutica *ex vivo* é o transplante de precursores hematopoéticos modificados, como por exemplo na  $\beta$ -talasemia. A aplicación *in vivo* emprégase en enfermidades como a distrofia muscular de Duchenne ou a amaurose conxénita. Neste apartado revisaremos os estudos que actualmente se están a levar a cabo sobre seres humanos con técnicas de edición xenética, así como algunhas das aplicacións terapéuticas que aínda están en fase preclínica, centrándonos en CRISPR-Cas9. Obviaremos as aplicacións da edición xenética nas CAR T, que serán tratadas máis adiante, dentro da inmunoterapia.

Malia que CRISPR-Cas9 e os sistemas derivados del presentan vantaxes xa vistas sobre as outras ferramentas, estas tamén se empregaron e se seguen a empregar en ensaios clínicos. En canto ás TALENs, non se atopou referencia a ningunha aplicación fora das CAR T (ver 6.3.3 Novas xeracións de CAR T). As ZFNs están a ser usadas *ex vivo* para o tratamento experimental de diversas enfermidades sanguíneas, como a inmunodeficiencia combinada severa, a anemia

de Fanconi, o síndrome de Wisckott-Aldrich ou a drepanocitose. Tamén se están a empregar para tratar o VIH inxectando linfocitos T autólogos modificados, KO para CCR5, que resulten inmunes ao virus (49). Noutras patoloxías, como a enfermidade de Fabry, de Hurler (mucopolisacaridose tipo I, MPSI) ou a hemofilia, (déficits de  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -L-iduronidase e factor IX, respectivamente), empregáronse AAV como vehículo para as ZFNs. Nestes casos, para compensar a baixa eficiencia de edición, dirixiuse a inserción do material xenético nun promotor moi expresado (albúmina). Precedidos de estudos preclínicos exitosos, comezáronse ensaios en humanos para MPSI, MPSII (86) e hemofilia tipo B (NCT02695160). Para a enfermidade de Fabry, atopouse un estudo cun vector viral co xene da de  $\alpha$ -galactosidase; NCT04046224) e outra estratexia con transplante de proxenitores editados *ex vivo* tamén con vectores virais (NCT02800070), ningún dos cales se encadra dentro do concepto de edición xenética.

No caso de CRISPR-Cas9, ademais do seu uso en CAR Ts, existen diversos estudos clínicos que a empregan en seres humanos, a maioría deles *ex vivo*. Tres ensaios clínicos en fases iniciais estudan a edición xenética de proxenitores hematopoéticos para o tratamento da  $\beta$ -talasemia en pacientes dependentes de transfusións. NCT04211480 é un ensaio aínda non iniciado para aproximadamente 12 pacientes coa mutación CVS-654, que se estima terá un seguimento durante 15 anos. No segundo estudo, NCT04205435, empregárase CRISPR-Cas9 para reactivar a cadea  $\gamma$  da hemoglobina, propia da hemoglobina fetal. Este estudo contempla o mesmo número de pacientes e período de seguimento que o anterior, e ambos se realizan no mesmo hospital (hospital “Central South University” de Xiangya, en China). O terceiro ensaio (NCT03655678) foi iniciado en 2018, e enrolará de 12 a 45 pacientes, que recibirán un transplante de precursores empregando CTX001 (células autólogas CD34+ modificadas con CRISPR-Cas9), e depende da empresa farmacéutica Vertex e de CRISPR-Therapeutics. Outro estudo cos mesmos promotores emprega o produto biolóxico CTX001 para o tratamento da drepanocitose, iniciado pouco despois (NCT03745287). Finalmente, outro ensaio aplica a tecnoloxía CRISPR-Cas9 para obter un KO de CCR5 en precursores hematopoéticos para o tratamento da infección por VIH, foi iniciado en 2017 en Beijing (NCT03164135) (87).

Recentemente púxose en marcha o primeiro ensaio clínico que vai empregar CRISPR-Cas9 *in vivo* en persoas. Trátase dun estudo en fases iniciais para o tratamento de pacientes coa mutación c.2991+1655A>G no intrón 26 do xene *CEP290* que padecen amaurose conxénita por dexeneración retineana. Recrutará a uns 18 pacientes entre os 3 e os 17 anos, distribuíndoos en 3 cohortes para estudar as doses (NCT03872479).

Existen datos dun traballo previo con CRISPR-Cas9 *in vivo* para o tratamento da neoplasia de cérvix intraepitelial por HPV, iniciado en 2017 no hospital da universidade de Guangzhou, en Guangdong, China. Pero segundo os últimos datos accesibles, este traballo nunca chegou a recrutar pacientes, e hai máis de dous anos que non se dispoñen datos actualizados do mesmo (NCT03057912).

Ademais, existen máis estratexias terapéuticas con CRISPR-Cas9 probadas en estudos preclínicos, con liñas celulares ou modelos animais, que poden chegar a trasladarse á clínica. Empregouse para a corrección posnatal da mutación *Fah59815B* en ratos, que causa tirosinemia, mediante transporte hidrodinámico. Se ben a eficiencia non foi moi elevada, os hepatocitos editados eran quen de sobrevivir e replicarse, resultando nunha selección dos mesmos (49). A súa aplicación *in vivo* veichulado partículas lipídicas liposomais tamén está a

ser explorada para outras patoloxías como a amiloidose por TTR , o déficit de  $\alpha$ -1-antitripsina ou a hiperoxaluria primaria (88).

En distrofia muscular de Duchenne CRISPR-Cas9 e as ZFNs foron empregadas de maneira análoga aos fármacos xa existentes, inducendo a exclusión dun exón, e causando deleccións do mesmo. Resultarían vantaxosas porque, a diferenza dos ASOs, só se precisaría dunha única aplicación da terapia. Ademais, permiten outras aproximacións, como sería a indución do desprazamento do marco de lectura eliminando codóns de stop prematuros, se ben aínda non está desenvolvida esta técnica, ou reparando as mutacións mediante HDR, pero esta é pouco eficaz en células quiescentes como as do tecido muscular (64). Os editores de bases, que permitirían cambios puntuais na secuencia, representan unha alternativa prometedora, e foron empregados con éxito sobre embrións de rato (89). Finalmente, outra opción terapéutica podería ser a indución da expresión da utrofina, proteína homóloga á distrofina cuxo xene está situado no cromosoma 6. Empregando o sistema CRISPRa e aumentando os niveis desta proteína na célula, podería substituír parcialmente á distrofina nas súas funcións (90).

No ámbito das enfermidades neurolóxicas, probouse o uso de Cas9 de *S. aureus* cun AAV en modelos animais de esclerose lateral amiotrófica (ELA). Dirixiuse a enzima cara o SOD1 para inducir o KO deste xen, cuxas mutacións están identificadas como causas de ELA familiar e esporádica. Igualmente, empregouse para eliminar a expansión repetitiva do C9orf72 en liñas celulares (91). Así mesmo, empregouse en modelos animais da enfermidade de Huntington para suprimir a expresión do xene *HTT*. Obtívose unha melloría da neurotoxicidade temperá sobre as neuronas estriatais, mellorando os déficits motores sen comprometer a viabilidade celular (92).

O sistema CRISPRa foi utilizado para inducir a produción hepática de insulina a través do promotor Pdx1 en ratos con *diabetes mellitus* tipo 1. Estes ratos conseguían manter niveis de glicosa en sangue máis baixos que os controis despois de administrárselles estreptomina como hiperglicemiante (90).

No ámbito cardiovascular, por citar algunhas aplicacións, conseguiuase unha prolongación da supervivencia e mellora da función cardíaca causando unha ablación do xene *PLN* en modelos murinos de fallo cardíaco. Tamén se describiu a corrección de mutacións no xene *MYCBPC3* en embrións humanos, causa de miocardiopatía hipertrófica, inxectando Cas9 xunto cos espermatozoides nos oocitos (49).

## 6. Inmunoterapia

### 6.1 NEOPLASIA E RESPOSTA INMUNE

A relación do sistema inmune coas neoplasias é complexa, podendo acontecer que a resposta inmune tanto favoreza o crecemento tumoral coma combata o tumor e incluso o elimine. A resposta inmunitaria do paciente contra o tumor vai ser un importante factor prognóstico, tan importante coma o sistema de estadiamento TNM para algunhas neoplasias, mostrando a importancia da vixilancia inmunitaria, tanto natural como inducida por terapias (93). Normalmente as neoplasias están infiltradas por células do sistema inmune, pero a función destas é variable. De forma xeral, cando se trata de linfocitos citolíticos o prognóstico é favorable porque contribúen á eliminación do tumor, mentres que no caso de macrófagos con fenotipo M2 (inmunosupresores), favorécese o crecemento tumoral. No microambiente priman factores como o TGF $\beta$  ou a IL-10 (que favorece a tolerancia inmunitaria), e están regulados á baixa outros como o IFN $\gamma$  ou a IL-2 (que favorece a expansión e supervivencia dos linfocitos). As clonas tumorais escapan da vixilancia inmunolóxica mediante diferentes mecanismos, como a sobreexpresión de mecanismos de tolerancia, mutación das proteínas implicadas na presentación de antíxenos ou a disregulación das respostas efectoras (94–96). Unha terapia clásica coma a radioterapia, ademais dos seus efectos citolíticos directos, ten demostrado efectos sobre a resposta inmune contra o tumor, sendo de feito os seus efectos menores en animais de laboratorio inmunodeprimidos. A radioterapia produce liberación de IFN I e  $\gamma$ , aumentando a expresión de VCAM-1 e CMH-I, e de DAMPs, así como á expresión de proteínas de retículo endoplásmico na membrana, todo o cal conduce a cambios no microambiente tumoral e no patrón de invasión linfoide estimulando a activación dos linfocitos e a lise das células tumorais. Pero por outra banda, tamén se produce a liberación de substancias protumorais como o TGF $\beta$ , e do equilibrio entre unhas e outras depende o nivel de activación inmune, de xeito que a radioterapia ten potencial para provocar respostas sistémicas mediadas pola inmunidade. Un exemplo disto é o coñecido como efecto abscopal, polo cal se produce a regresión de lesións metastáticas cando se aplica radioterapia local (97,98).

A inmunoterapia busca, mediante distintas estratexias, modular de xeito específico o sistema inmune de xeito que a resposta deste sexa a eliminación tumoral: fármacos, citocinas, anticorpos inmunomoduladores, vacinas, virus oncolíticos, anticorpos contra o tumor e terapias celulares (99).

### 6.2 ESTRATEXIAS DE INMUNOTERAPIA

Nas neoplasias, os linfocitos T están permanentemente expostos aos antíxenos, ao contrario dunha infección aguda. Deste xeito, en vez de resolverse e de se formaren linfocitos de memoria, os linfocitos sofren un proceso de extenuación mediante o que expresan cofactores inhibidores na membrana. Algúns destes factores que inducen a tolerancia inmunolóxica son o PD-1 e o CTLA-4, e a súa inhibición pode reactivar a resposta inmune contra o tumor. Este é precisamente o mecanismo de acción dos inhibidores de *checkpoints*: os antiPD-1 e antiPDL-1 (do ligando de PD-1 que expresan moitos tumores) e os antiCTLA-4. CTLA-4 é unha molécula inhibidora que compite polo ligando (CD80) dunha molécula coactivadora (CD28), cuxa función é necesaria para a activación do linfocito a través do complexo maior de histocompatibilidade tipo 2 por parte da célula presentadora de antíxeno. Deste xeito, o balance entre CTLA-4 e CD28 regula o grao de activación dos linfocitos e bloqueando CTLA-4 favorecemos a supervivencia dos linfocitos, evitamos o freo á activación, e estimulamos a

resposta inmune contra o tumor. Para isto existen dous fármacos, ipilimumab e tremelimumab, cuxo uso está aprobado para melanoma, cancro colorrectal e carcinoma de células renais (100).

Por outro lado, o PD-1 é un receptor presente en linfocitos xa activados, da mesma familia que o CTLA-4. Cando se une aos seus ligandos, PDL-1 e PDL-2, moi expresados en tumores, inhíbese a proliferación, expresión de IL-2, IFN- $\gamma$  e redúcese a supervivencia da célula. Bloqueando PD-1 ou o seu ligando PDL-1 evitamos este freo á actividade do linfocito e favorecemos a resposta inmune contra o tumor. Nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab avelumab e cemiplimab son os fármacos con esa función cuxo uso está aprobado para múltiples cancros como melanoma metastático, carcinoma de pulmón, de células renais, de células de Merkel, gástrico ou linfoma de Hodgkin. A principal diferenza entre ambos sistemas é que con PD-1 intervimos a nivel periférico, sobre linfocitos que experimentaron o proceso de extenuación, volvendo a activalos, mentres que o CTLA-4 funciona a un nivel máis primordial ao afectar á propia maduración. Ademais, ao estar PDL-1 tipicamente sobreexpresado no tumor, o sistema antiPD-1 tería maior especificidade, sendo interesante o seu bloqueo xa que os niveis altos de PDL-1 están relacionados en algunhas neoplasias cunha alta agresividade e mal pronóstico cos tratamentos habituais (100,101). Aínda que menos importantes que os da quimioterapia convencional, presentan tamén efectos adversos a nivel hematolóxico, endocrinolóxico, respiratorio e gastrointestinal entre outros, ademais da activación ou reactivación de procesos autoinmunes.

Mogamulizumab é un anticorpo aprobado para o tratamento de linfomas cutáneos refractarios (síndrome de Sèzary e micose fungoide) cuxa diana é o receptor de citocinas CCR4 dos linfocitos. Este receptor permite a migración dos linfocitos á pel e está expresado en aproximadamente o 40% destas patoloxías. Mogamulizumab únese a CCR4 e induce citotoxicidade sobre os linfocitos tumorais. Os efectos adversos máis comúns que produce son linfopenia e neutropenia (de grao catro ata no 70% dos pacientes), reaccións transfusionais e pirexia. Tamén se describiu polimiosite, retinite por CMV e sepsis (102).

Outra estratexia que pretende tanto estimular respostas preexistentes como xerar novas é a utilización de virus oncolíticos, virus atenuados naturais ou editados xeneticamente que infectan selectivamente as células tumorais. Os máis estudados son os herpes virus, sendo talimogene laherparepvec (T-Vec ou Imlygic) un HSV xeneticamente modificado aprobado para o tratamento do melanoma metastático, que non só actúa a nivel local senón que presenta efecto abscopal estimulando o recrutamento de linfocitos T en lesións metastáticas. Pero tamén está descrito o uso de vaccinia virus, Newcastle disease virus (NDV), coxsackie, reovirus, sarampelo e adenovirus para estes fins. O mecanismo antitumoral dos virus oncolíticos baséase en producir efectos citotóxicos de xeito directo e indirecto, a través de estimular a autólise, a resposta inmune mediante anticorpos, citotoxicidade celular e mediada por complemento e a destrución do aporte vascular. Serven como adxuvante de outras formas de inmunoterapia como os inhibidores de *checkpoints*, onde se atopa que a combinación destes con virus é superior á monoterapia, postulándose ademais que poden servir para evitar algúns mecanismos de resistencia aos mesmos que acaba por desenvolver o tumor. O efecto directo consiste na detección de PAMPs nas células infectadas, o que leva á expresión de TNF e IFN, estimulando unha cascada de acontecementos que culminan cunha apoptose inmunoxénica, expresándose citoquinas proinflamatorias. O efecto citotóxico directo dos virus é dose dependente, e resulta moi ben tolerado polos pacientes incluso a altas doses. Algúns virus en concreto, como o coxsackie, afectan directamente a rutas esenciais para a supervivencia celular (ERK/MEK). Ademais, os virus presentan un efecto de “vacinação” contra o tumor, existindo a posibilidade

de empregarse o virus como vector de antígenos tumorais. O ambiente inflamatorio que se produce en torno ás células tumorais infectadas leva a unha maduración de células presentadoras de antígenos, coa consecuente activación de linfocitos CD4 e CD8, pero tamén á reactivación de linfocitos T de memoria residentes no tecido. Así, xeramos unha resposta inmune fronte á neoplasia. Con todo, polo momento este mecanismo non semella ter un gran impacto na clínica. Comprobouse que a eficacia desta resposta é distinta segundo o grao de exposición a antígenos do tecido diana: o fígado responde máis intensamente que por exemplo o músculo estriado ou o pulmón, probablemente debido a unha maior activación basal das células inmunes residentes do fígado fronte a estes outros tecidos. O principal inconveniente que presentan é que teñen unha biodisponibilidade a nivel sistémico moi baixa, xa que son rapidamente opsonificados por anticorpos e complemento, soamente resultando eficaces polo momento en inxeccións locais (96).

Existen outras técnicas que, á marxe da radioterapia, pretenden destruír con métodos físicos o tumor coa fin de estimular a inmunidade contra el. Os métodos hipertérmicos, coma o láser, a ablación con microondas ou con radiofrecuencia, producen necrose coagulativa que orixina unha área inflamatoria de penumbra ao redor, particularmente importante para a resposta inmune. A crioablación resulta máis inmunoxénica probablemente por producir unha menor desnaturalización das proteínas, acontecendo de novo unha inflamación en torno á lesión. A electroporación irreversible consiste na aplicación de pulsos de alto voltaxe que producen oncolise sen unha alteración estrutural tan grande como os métodos térmicos, potencialmente cambiando o microambiente tumoral e rematando coa tolerancia inmunolóxica. O uso de citostáticos seguidos da aplicación de pulsos eléctricos permite mellorar a penetración dos mesmos, e no caso do cisplatino, estimular a invasión do tumor por linfocitos CD8 citotóxicos. A terapia fotodinámica baséase na sensibilización con axentes químicos que, ao seren estimulados con láser, producen radicais libres que causan apoptose e necrose; o seu uso está aprobado no linfoma cutáneo de células T e no Síndrome de Sézary. Estas estratexias permiten a combinación con outras formas de inmunoterapia local ou sistémica, coma os inhibidores de *checkpoints*, para potenciar os seus efectos (93).

## 6.3 CÉLULAS CAR T

### 6.3.1 Concepto. CAR Ts aprobadas

As células CAR T son linfocitos modificados xeneticamente para expresar na súa membrana plasmática un receptor CAR (receptor quimérico de antígenos) que se infunden aos pacientes como terapia para neoplasias fundamentalmente hematolóxicas. Este receptor confírelles especificidade contra as células tumorais, activando ao linfocito T fronte á neoplasia. CAR é unha molécula transmembrana quimérica, que consta de tres rexións. Unha primeira porción extracelular, análoga á rexión variable dos anticorpos, con capacidade de recoñecemento antixénico. Unha segunda porción transmembrana, que cumpre funcións estruturais, xa que a distancia á que se produce a interacción entre células é clave na acción citotóxica do linfocito. E unha terceira porción intracelular, que transduce sinais de activación, xeralmente análoga á porción intracelular de sinalización do TCR CD3- $\zeta$  (cadea zeta do receptor de células T ; pero tamén pode empregarse o Fc $\epsilon$ R1). Isto permite que o recoñecemento

do antígeno por parte do linfocito T sexa independente dos CMH (complexo maior de histocompatibilidade) (Figura 4), aínda que se poden deseñar anticorpos que recoñezan o CMH unido a certos péptidos para permitir a detección de antígenos intracelulares. CAR é funcional en células T KO para TCR, así como para outras células sen TCR coma os linfocitos NK (103), polo que é suficiente para activar á célula sen necesidade da presenza desta molécula.

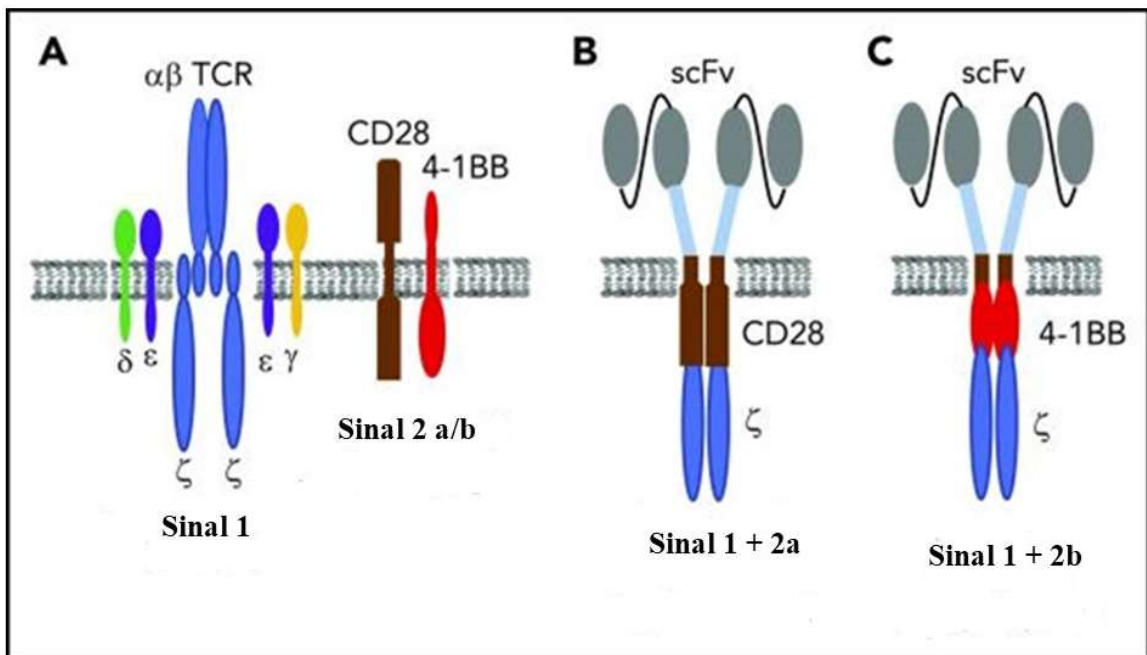


Figura 4: A) TCR e coestimuladores dun linfocito T normal. B e C) CAR coas porcións extracelular de recoñecemento (scFv de inmunoglobulina) e intracelular de activación (sinal 1), asociada a sinal coestimulador (sinal 2a e 2b; segunda xeración de CAR Ts, ver apartado 6.3.3). Figura obtida de (104)

Actualmente hai aprobados en Europa e Estados Unidos dous fármacos que conteñen linfocitos CAR T: Kymriah (tysagenlecleucel) e Yescarta (axicabtagene ciloleucel). Kymriah é un preparado de CAR T autólogos modificados cun vector lentiviral que codifica un CAR-CD19. Ten dúas indicacións en ficha técnica: leucemia linfoblástica aguda en recaída post transplante ou en segunda liña en menores de 25 anos, e linfoma B difuso de célula grande en recaída ou refractario tras dúas liñas de tratamento en pacientes adultos. Yescarta comparte esta última indicación, e pode ser empregado tamén para linfoma B primario mediastínico de células grandes. Neste caso, os linfocitos son tamén CAR-CD19, pero neste caso emprégase un vector retroviral. Actualmente estanse a facer ensaios clínicos comparando ambos fármacos (NCT03642626), así como para explorar novas indicacións, combinacións con outros fármacos biolóxicos e formas de previr a súa toxicidade. A continuación axúntase unha táboa (Táboa 4) cos ensaios clínicos que se están a levar a cabo con estes dous fármacos.

**Táboa 4: Ensaio clínicos en desenvolvemento con CAR T aprobadas.** a) Ensaio con fármaco para previr neurotoxicidade por CAR T; b) Ensaio con fármaco para previr o CRS por CAR T; c) quimioterapia estándar para NHL, a base de platino; NHL: linfoma non Hodgkin. LLA: leucemia linfoide aguda. DLBCL: linfoma difuso de células B grandes. FL: linfoma folicular. TFL: linfoma folicular transformado. HGBCL: linfoma B de alto grado. PMBCL: linfoma B mediastínico primario. PCNSL: linfoma primario de sistema nervioso central. (rr): enfermidade refractaria ou recorrencia. (mer): mínima enfermidade residual. (p): pacientes en idade pediátrica)

Fármaco	Combinación	Indicación a estudo	Fase	NCT
Yescarta	citostáticos	Linfoma células B (primeira liña)	2	NCT03761056
Yescarta	citostáticos e utomilumab	DLBCL (rr)	1, 2	NCT03704298
Yescarta	citostáticos	FL, Linfoma zona marxinal, NHL indolente (rr)	2	NCT03105336
Yescarta	citostáticos	DLBCL (rr), TFL, PMBCL, HGBCL	1, 2	NCT02348216
Yescarta	citostáticos e lenzilumab	DLBCL (rr)	1, 2	NCT04314843
Yescarta	citostáticos e rituximab	DLBCL (rr)	2	NCT04002401
Defibrotide <sup>(a)</sup>	yescarta	DLBCL (rr), síndromes de neurotoxicidade	2	NCT03954106
Yescarta vs Kymriah	citostáticos	ALL, DLBCL		NCT03642626
Yescarta	acalabrutinib	NHL, DLBCL, HGBCL, PMBCL, TFL	1, 2	NCT04257578
Anakinra <sup>(b)</sup>	yescarta	DLBCL (rr), HGBCL (rr), PMBCL (rr), TFL (rr),	2	NCT04205838
Kymriah	non	NHL	2	NCT04161118
Kymriah	non	PCNSL	1	NCT04134117
Kymriah vs blinatumomab e inotuzumab	non	ALL	3	NCT03628053
Kymriah	citostáticos	LLA, NHL, CLL E III e IV	1	NCT02529813
Kymriah	non	ALL (p)	2	NCT04225676
Kymriah	non	ALL (mer)	2	NCT03876769
Kymriah vs QMT <sup>(c)</sup>	non	NHL	3	NCT03570892

As CAR T, malia que poderían constituir un bo tratamento para os tumores sólidos metastáticos polo seu efecto sistémico dirixido, aínda non amosan tan bos resultados coma nas neoplasias hematolóxicas. Con todo, é unha liña na que se está a investigar, habendo ensaios en fases iniciais en curso para glioblastoma, colon, páncreas, próstata, ril, ovario, mama e pulmón. Son importantes retos a superar o optimizar a accesibilidade das CAR T ás células neoplásicas, sobrepoñerse ao microambiente de inhibición inmune ou resistir o estrés oxidativo derivado do metabolismo tumoral. Unha das principais dificultades é a escaseza de dianas apropiadas, xa

que normalmente non expresan un antíxeno específico, senón multitude deles que tamén están presentes en tecidos normais, como o CEA (colorrectal), ERBB2 (glioblastoma), mesotelina (mesotelioma, páncreas) ou o PSMA (próstata). Así, en moitos ensaios preliminares obtivéronse toxicidades *on-target off-tumor*, en algúns casos non asumibles. Para remedialas, estanse a probar novas estratexias, que se expoñen máis adiante, entre as que destacamos o uso de receptores TGF $\beta$  dominantes negativos por primeira vez en humanos, sen problemas de toxicidade polo momento. Outra consideración a ter en conta coas dianas é a necesidade de que estas se expresen na membrana, xa que maior parte das proteínas da célula estarán ocultas ao CAR. Unha estratexia que permite evitar este problema é o emprego de CAR T baseadas en *nanobodies* dirixidas a moléculas do microambiente (como PD-L1) en vez de antíxenos na superficie da células tumorais (105). Tamén se emprega a expresión de receptores de citocinas para mellorar o acceso ao tumor, ou de interleucinas para mellorar a proliferación das CAR Ts como se recolle na táboa nº 5 (103,106).

### 6.3.2 Universalidade e efectos adversos

A estratexia inicial no uso das CAR T consiste en extraer mediante aférese e modificar os linfocitos do propio paciente para posteriormente inxectarllos, un proceso custoso, suxeito a erros nos procedementos e longo no tempo, do que pode non dispoñerse en algúns pacientes. Ademais, nalgúns casos os linfocitos do suxeito sofren de disfunción por mor da enfermidade, e non resultan axeitados. Para evitar isto, xorde a alternativa de empregar CAR T de doantes autólogos, obtidos de sangue periférico, cordón umbilical e, teoricamente, iPSCs, se ben estas aínda non foron empregadas en clínica. O uso destas células permite abaratar custos, dispoñer do tratamento en canto é necesario e facer múltiples modificacións sobre elas de xeito máis sinxelo. Pero presentan dous problemas fundamentais: por un lado, o rexeitamento por parte do sistema inmune do suxeito, e polo outro unha enfermidade de enxerto contra hóspede (GVHD). Para evitar que as células T do paciente reaccionen fronte ás CAR T é necesario producir unha depleción linfoide mediante quimioterapia (ciclofosfamida e fludarabina normalmente). Existe a posibilidade de empregar alemtuzumab (antiCD52) xunto con CAR T KO para o CD52, causando depleción linfoide que pode ser mantida no tempo sen afectar á función das CAR T. Tamén se poden buscar doantes cun CMH compatible ou modificar as CAR T para non presentar CMH-I (knock out para a  $\beta$ 2-microglobulina) e expresar (HLA-E, HLA-G) ou sobreexpresar (ligandos de siglec7 ou siglec 9) inhibidores da acción dos NKs, que actúan fronte a células que non expresan o CMH-I. As células con dobre KO para  $\beta$ 2-microglobulina e a subunidade  $\alpha$  do TRC (TRAC) denomínanse Universal-CARTs ou UCARTs (7,107).

A GVHD acontece cando os TCR das CAR T son reactivos aos complexos CMH-péptido do hóspede, causando dano tisular. En casos onde o paciente fose tratado cun transplante de proxenitores hematopoéticos, pode evitarse a GVHD empregando como donante ao mesmo suxeito. Pero fora destas situacións, preséntanse dúas alternativas: o emprego de linfocitos doutra clase (NK ou T $\gamma\delta$ ) e a edición xenética. As células NK son linfocitos citolíticos que se activan segundo o balance entre os sinais inhibitorios e activadores que reciban. Modificados cun CAR, empréganse en ensaios clínicos dirixidos fronte a dianas tumorais como EGFR ou CD19, portando outras modificacións como IL-15 para aumentar a actividade, previr a extenuación e aumentar a supervivencia *in vivo* (108). Outras subpoboacións de NKs, como os iNKT, linfocitos cun TCR que só reconece antíxenos presentados por CD1d resultan tamén alternativas prometedoras. En experimentación clínica e preclínica respectivamente, esta clase

de linfocitos demostrou actividade protectora fronte a GVHD en transplante e actividade fronte a linfomas ao seren modificados con CAR-CD19. Finalmente, os linfocitos  $T\gamma\delta$  son unha subpoboación circulante e residente en tecidos epiteliais, con pouca tendencia a acceder a rexións non inflamadas, cuxo TCR non se restrinxen ao recoñecemento de antíxenos mediante CMH. Por este motivo, non induce GVHD coma os  $T\alpha\beta$ , mantendo a actividade antitumoral ao ser modificados con CAR (107).

A enfermidade de enxerto contra hóspede que acabamos de expoñer é un dos grandes efectos adversos, pero non o único. As CAR tamén teñen como diana células sas, xa que estas proteínas non son exclusivas do tumor, no que se chama efecto “*on-target off tumor*”. As CAR-CD19, as máis empregadas, causan importante depleción linfoide B, mentres que por exemplo as CAR-Erb2 causan unha insuficiencia cardiopulmonar letal ao afectar aos pulmóns sáns. O síndrome de liberación de citocinas (CRS) é unha activación aguda do sistema inmune resultado da liberación masiva por parte dos CAR T e do sistema inmune do propio suxeito de factores entre os que destacan IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e particularmente IL-6. Pode desencadear activación sistémica do sistema mononuclear (resposta inflamatoria sistémica con febre alta, hepatoesplenomegalia, linfadenopatías, coagulación intravascular diseminada (109)), aumento de permeabilidade vascular (*vascular leakage syndrome*, causando anasarca, edema de pulmón, derrame pericárdico e potencialmente fallo multiorgánico (110)), que pode poñer en perigo a vida do paciente. Un CRS grave require dun diagnóstico precoz, que esixe un diagnóstico diferencial cunha sepsis, e tratamento precoz con esteroides, mesmo bloqueo do eixo IL-6 con tocilizumab. As CAR T tamén poden causar neurotoxicidade con alteración do nivel de conciencia, alucinacións, *delirium*, afasia e mioclonías, de mecanismo incerto. Pénsase que se pode producir unha infiltración difusa do sistema nervioso central polas CAR T, que podería estar relacionado coa afectación da barreira hematoencefálica polo CRS. Entre os efectos adversos máis graves tamén está descrito o síndrome de lise tumoral tras a infusión de CAR Ts (103,111). Finalmente, comentar un caso descrito no que se produciu unha complicación grave e totalmente inesperada. Induciuse resistencia á terapia por introducir inadvertidamente o CAR nunha célula maligna, de xeito que o CAR cubría os epítomos do propio CD19 da membrana facéndoo irrecoñecible polas CAR T (112).

### 6.3.3 Novas xeracións de CAR T

Para mellorar os resultados das primeiras CAR T fixéronse novas modificacións en sucesivas xeracións. Primeiro, na segunda xeración, engadiuse un sinal coestimulador a través de algunha das moléculas CD28, 4-1BB (CD137), OX40, ICOS ou CD27, obténdose un aumento da actividade antitumoral, supervivencia e activación dos linfocitos. CD28 activa a vía PI3K/Akt/mTOR, estimulando a captación de glicosa, metabolismo anaeróbico da mesma e produción de ATP. Mentres que 4-1BB estimula a vía Wnt/ $\beta$ -catenina primando a oxidación de ácidos graxos e a capacidade respiratoria celular. Semella que a coactivación con CD28 favorece a formación de células efectoras (CCR7-), mentres que a vía Wnt/ $\beta$ -catenina favorecería un fenotipo máis persistente en sangue periférica (células CCR7+). Na terceira xeración combinouse a acción das vías anteriores, pero non resultaron superiores á segunda xeración. Actualmente trabállase nunha “cuarta xeración” de CAR T que, ademais dun coestimulador, expresen outros elementos funcionais, como a liberación de interleucinas,

receptores de citocinas, sistemas de *on-off* ou xenes suicidas. As TRUCKs serían células CAR T de cuarta xeración modificadas cun casete de expresión constitutiva ou inducible dun polipéptido transxénico, cuxa liberación está condicionada á activación do CAR (promotor NFAT6-IL-2). Deste xeito, ademais do efecto das anteriores xeracións, obtemos a vantaxe de liberar de xeito local moléculas coma as interleucinas IL-12 ou IL-18, que activan a resposta inmune e reducen a supresión mediada por linfocitos Treg (7,103).

Nesta cuarta xeración de CAR Ts preténdense superar moitas destas barreiras descritas, e algunhas que se expoñen máis adiante. Explóranse estratexias diferentes, coma os linfocitos iCAR, que proveen sinais inhibitorias e que se poderían utilizar contra antígenos secundarios para evitar a actividade fora do tumor doutros CAR T e polo tanto toxicidades (113). Os CAR condicionais son receptores formados por dúas cadeas que precisan dimerizar para formaren o CAR activo, pero para isto precisan da presenza dunha terceira molécula que nós administraríamos ao paciente, empregándoa como interruptor e regulador da actividade dos CAR T (114). Diseñáronse novos CAR (CD19-BBz(86)) que inducen menor secreción de citocinas, e polo tanto reducirían os casos de toxicidade por CRS, mantendo a súa potencia antitumoral (115). Por outro lado, o emprego de CARs que recoñezan o segmento Fc das inmunoglobulinas permite dirixir aos linfocitos contra diversos antígenos simultánea ou secuencialmente administrando ao paciente anticorpos contra eles (116). Tamén se traballou no deseño de CAR Ts con múltiples especificidades. Unha estratexia consiste nos chamados TanCAR, armados con dúas porcións scFV cada unha das cales recoñece un antígeno, sendo un só recoñecemento suficiente para a activación (operador booleano OR), de xeito que permite eliminar subclonas tumorais que perdan a expresión dun dos antígenos, tendo maior especificidade por células que presenten ámbolos dous (117). A outra consiste en co-expresar dous CAR diferentes, un convencional coa porción activadora de CD3 e outro que transmite o sinal de CD28, sendo necesaria a activación simultánea de ambos para obter a activación linfocitaria (operador booleano AND) de xeito que permite reducir a toxicidade (118). Os switch-CAR T son linfocitos equipados con correceptores quiméricos, que recoñecen unha molécula na porción extracelular pero posúen a porción intracelular dun receptor distinto, de xeito que poden converter un sinal inhibitorio en activador, ou viceversa. Por outro lado, unha estratexia para obter especificidade tumoral, deseñada para tumores sólidos, é a incorporación dun péptido que bloquee a actividade do CAR ata alcanzar o microambiente tumoral, onde as condicións ambientais desactiven esta inhibición (119). Finalmente, enumerar os TRUCKs, capaces de liberar péptidos coma citocinas ou anticorpos no leito tumoral, ou os CAR T con transxéns codificantes de receptores ou enzimas que melloren a súa supervivencia, replicación ou mobilidade na matriz extracelular. Elaborouse unha táboa (Táboa 5) para resumir as diferentes modificacións externas ao CAR que se exploraron nos últimos anos.

Táboa 5: estratexias alleas ao CAR na cuarta xeración.

Vía molecular	Modificación	Obxectivo	Técnica empregada	Ano	Ref.
CD7	KO	evitar fratricidio en CAR-CD7	Edición con CRISPR-Cas9	2018	(120)
Caspase 9	KI transxene inducible farmacoloxicamente	eliminar as CAR T en caso de efectos adversos	Transdución viral	2017	(121)
IL-15	KI IL-15; TRUCK	aumentar supervivencia e actividade COMPROBAR	Transdución viral	2010	(122)
IL-12	KI IL-12; TRUCK	evitar evasión inmune	Transdución viral	2013	(123)
IL-18	KI IL-18; TRUCK	evitar evasión inmune	Transdución viral	2017	(124)
GM-CSF	KO	reducir expresión de ILs e o CRS	Edición con CRISPR-Cas9	2019	(125)
TGFb	KI scFv-antiTGFb; TRUCK	neutralizar TGFb extracelular	Transdución viral	2018	(126)
TGFb	KI dnTGF-βRII- (en membrana)	reducir sinal de TGFb cun receptor sen actividade	Transdución viral	2018	(127)
FAS	KO	evitar a toxicidade Fas-FasL sobre as CART	Edición con CRISPR-Cas9	2017	(128)
CMH-I	KO de β2microglobulina	evitar rexeitamento das CAR T vía CMH-I	Edición con CRISPR-Cas9	2017	(128)
TCR	KO da TACR	evitar GVHD suprimindo o TCR das CAR T	Edición con CRISPR-Cas9	2017	(128)
TCR	KI de CAR	expresión de CAR no locus de TCR, mellor actividade	Edición con CRISPR-Cas9	2017	(129)
PD1	KO	evitar a vía inhibitoria efectora PD1-PDL1	Edición con CRISPR-Cas9	2017	(128)
PD1	KI transxene antiPD1; TRUCK	bloquear PD-1 aumentando a supervivencia	Transdución viral	2017	(130)
CTLA-4	KO	evitar a vía de inhibición da activación CD28; CTLA4-B7	Edición con CRISPR-Cas9	2017	(128)
CCR5	KO	resistencia ao VIH, para pacientes xa infectados	TALEN	2017	(131)
Catalase	KI catalase; TRUCK	aumentar supervivencia CAR T reducindo estrés oxidativo	Transdución viral	2016	(132)
HVEM	KI HVEM; TRUCK	recuperar mecanismo de supresión tumoral en linfomas (HVEM; BTLA)	Transdución viral	2016	(133)
CD28	KI switch-receptor (PD1-CD28)	convertir o sinal inhibitorio de PD1 en activador CD28	Transdución viral	2016	(134)
IL-7	KI transxén cadea alfa IL7R	restaurar resposta a IL7 e promover a diferenciación a Th1	Transdución viral	2014	(135)
IL-7	KI transxene switch-receptor (IL4R-IL7R)	Convertir sinal inhibitorio de IL4 en sinal activador IL7	Transdución viral	2017	(136)
Heparanase	KI heparanase	Degradar a matriz extracelular aumentando a mobilidade	Transdución viral	2015	(137)

### 6.3.4 CAR T e inhibidores de *checkpoints*

Sendo o PD1 unha importante vía de escape da resposta inmune para as neoplasias, causa de anerxia sobre os linfocitos e probable causa do acurtamento da supervivencia das CAR T, semella lóxico facer terapia combinada con inhibidores de *checkpoints*. TRUCKs portadoras de anti-PD-1 e CAR T KO para PD1 resultaron máis efectivas que CAR T convencionais en modelos de cancro de pulmón e hepatocarcinoma, respectivamente. Así mesmo, hai evidencia sobre a eficacia de rescates con anti-PD1, cun caso de mantemento da resposta con doses baixas repetidas de nivolumab, en pacientes que recaen tras resposta a tratamento con CAR T. Estudos de laboratorio propoñen sinerxia entre a estimulación do CAR e a inhibición do sinal de PD1, aumentando a potencia e capacidade de expansión das células (111). Emporiso, algúns estudos suxiren que o mantemento do bloqueo da vía PD1 pode inducir sobreexpresión de TIM-3 e LAG-3, e ter de xeito paradoxal consecuencias negativas sobre a actividade e persistencia dos linfocitos, inducendo extenuación. Tamén se describen casos de reactivacións agresivas da enfermidade inducidas por tratamento anti-PD1. Ademais, o KO de PD1 nas CAR T reduce a longo prazo a actividade antitumoral, por un exceso de diferenciación prematura dos linfocitos (138), o que por outro lado podería xustificar os efectos de sinerxia iniciais ao aumentar os linfocitos activos. Así, posiblemente PD1 xogue un papel na maduración linfocitaria, e non constitúa só no freo da súa activación, polo que se require investigación sobre a combinación de CAR T e inhibidores de *checkpoints*. Por outro lado, está descrita a combinación de CAR T con vacinación tumoral, con virus recombinantes que expresan proteínas tumorais. Trátase dunha investigación preclínica en modelos animais con resultados prometedores, pero emprega CAR Ts con TCR, fora da liña da obtención de células universais (139).

### 6.3.5 Papel de CRISPR-Cas9 nas novas CAR T

As estratexias das novas xeracións de CAR T requiren de múltiples cambios sobre os linfocitos de forma simultánea, con KO dalgúns xenos e inducendo a expresión doutros. Os vectores virais son un mecanismo efectivo e ata agora seguro de transdución do CAR e de outros xenos. Pero tanto os lentivirus como os retrovirus integran a súa carga no ADN de xeito aleatorio, de feito que os efectos son imprevisibles, co risco potencial de que estes cambios resulten oncoxénicos ou alteren a función do linfocito. Por outro lado, as ferramentas tipo TALENs e ZFNs, se ben foron utilizadas en clínica, requiren dun longo proceso de deseño e validación, e a edición múltiple é moi complexa. CRISPR-Cas9 consegue unha alta eficiencia, conseguindo bos resultados en edición múltiple (*multiplex editing*), e ofrece a posibilidade de dirixir a integración do material xenético introducido a través de recombinación homóloga. Permite solucionar os problemas que se presentaban coas outras ferramentas e facilita enormemente problemas como o da universalidade ou a mellora da supervivencia en ambientes tumorais (7,140).

CRISPR-Cas9 xa foi empregada en diversas ocasións no deseño de novas CAR T (ver táboa 5). Empregouse para eliminar o CD7 (marcador de células T) en CAR T dirixidas contra neoplasias de linfocitos T e evitar así o fratricidio entre células T. Tamén foi empregada para o KO de distintos xenos bloqueando diversas vías de anerxia dos linfocitos: FAS, que induce toxicidade pola interacción FAS-FASL; o PD1 ou o CTLA-4, xa comentados. Tamén se conseguiu evitar a formación do CMH-I mediante o KO da  $\beta$ 2-microglobulina, necesaria para

a presenza na membrana deste, o que evita que as CAR T sexan rexeitadas polo sistema inmune do paciente por esta vía. Para reducir a GVHD e o CRS, conseguiuuse o KO de TCR, evitando a activación non mediada por CAR, e do GM-CSF, reducindo a cantidade de citocinas liberadas polas CAR T sen perda de eficacia. Finalmente, CRISPR-Cas9 permitiu a inserción dirixida do CAR dentro da rexión TCR, permitindo unha expresión máis fisiolóxica do CAR, mediada polo promotor do TCR, cun KO simultáneo deste.

Con todo, existen algúns inconvenientes referentes á seguridade no uso de CRISPR-Cas9 que deben ser controlados. En primeiro lugar, os efectos *off-target* poden producir mutacións aleatorias que poderían afectar a xenes supresores de tumores ou protooncoxenes. Por isto, deberían estudarse os posibles efectos *off-target* que se dan coas secuencias diana escollidas para poder avaliar o perfil de seguridade (140). Dispoñemos de estratexias para abordar estes problemas, optimizando o sgRNA (lonxitude do mesmo e elección de dianas) e a Cas9: moléculas con diferentes PAMs, nickases, e variantes con menos tendencia a erros. En segundo lugar, aínda que con baixa probabilidade, coa edición múltiple poden ocorrer translocacións debido ás múltiples roturas de dobre cadea que se producen. A análise sistemática dos produtos de edición mediante técnicas como a citoxenética ou a secuenciación combinados con predicións *in silico* permiten minimizar os riscos á hora de infundir as células nos pacientes (140–142).

En canto ao transporte de CRISPR-Cas9, é preciso un método que resulte o menos tóxico posible para os linfocitos. Os de vectores virais teñen de novo o risco potencial de mutaxénese e a presenza mantida de Cas9 na célula aumenta os efectos *off-target*, pero presentan unha elevada eficiencia e son moi empregados para o transporte do ADN exógeno. A electroporación tamén é un método empregado frecuentemente pola súa sinxeleza e seguridade, con pouca toxicidade para as células e que, en combinación con técnicas de edición múltiple permite someter aos linfocitos a un único proceso de transporte (o que reduce a toxicidade), conseguindo con el todas as modificacións necesarias (7,141).

En resumo, as novas CAR T baséanse en múltiples edicións xenéticas que permitan ben a súa universalidade, ben a introdución de mecanismos de control e redución de efectos adversos, así como mellorar a súa eficacia mediante o aumento da supervivencia e a evitación dos mecanismos de anerxia do tumor. CRISPR-Cas9 postúlase como ferramenta de referencia para o deseño de novas CAR T que sexan seguras e poidan acadar mellores resultados clínicos, e poidan chegar a revolucionar o tratamento dos tumores sólidos. Así mesmo, deberase probar en futuras investigacións a utilidade das ferramentas emerxentes, como o prime editing, nestes campos.

## 7. Abreviacións

Coa fin de facilitar a lectura, ofrécense ordenadas alfabeticamente algunhas das abreviacións e siglas máis empregadas ao longo do traballo, co seu significado en lingua inglesa e algunhas anotacións.

- AAV: *adeno-associated virus*
- AdV: adenovirus
- AME: atrofia muscular espiñal
- ASO: *anti-sense oligonucleotide*
- AuNP: nanopartículas de ouro
- BE: *base editing*
- Cas: *CRISPR associated (gene)*
- CAR: *chimeric antigen receptor*
- crRNA: CRISPR RNA
- CPP: *cell penetrating peptides*
- CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- CRS: *cytokine release syndrome*
- DAMPs: *damage associated molecular patterns*
- dCas9: *dead Cas9*, sen actividade catalítica
- DMAE: dexeneración macular asociada á idade
- EMA: *European Medicines Agency*,
- FDA: *Food and Drug Administration*
- gRNA: *guide RNA*
- HDR: *homoly directed repair*, recombinación homóloga
- Indels: insercións-deleccións
- KI: *knockin*
- KO: *knockout*
- LV: lentivirus
- CMH: complexo maior de histocompatibilidade
- MPS: mucopolisacaridose
- NHEJ: *non homologous end joining*, recombinación non homóloga
- PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*
- PE: *prime editing*
- pegRNA: *prime editing guide RNA*
- RNP: ribonucleoproteína
- sgRNA: *synthetic guide RNA*
- SNPs: *single nucleotide polymorphisms*
- TALENs: *transcription activator-like effector nucleases*
- TCR: *T cell receptor*
- TLR: *toll-like receptor*
- tracrRNA: *trans-activating CRISPR RNA*
- TRUCK: *T cell redirected for universal cytokine-mediated killing*
- VCAM: *vascular cell adhesion molecule 1*
- ZFNs: *Zinc-finger nucleases*

## 8. Bibliografía

1. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing [Internet]. Vol. 578, *Nature*. 2020 [cited 2020 Feb 13]. p. 229–36. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
2. Porteus MH. A new class of medicines through DNA editing. *N Engl J Med*. 2019;380(10):947–59.
3. EMA (European Medicine Agency). Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. *Eur Med Agency Guidel* [Internet]. 2018 [cited 2020 Mar 26];44(March):1–41. Available from: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
4. Rare diseases | Salud pública [Internet]. [cited 2020 May 6]. Available from: [https://ec.europa.eu/health/non\\_communicable\\_diseases/rare\\_diseases\\_es](https://ec.europa.eu/health/non_communicable_diseases/rare_diseases_es)
5. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Vol. 15, *Einstein* (Sao Paulo, Brazil). 2017. p. 369–75.
6. Tambuyzer E, Vandendriessche B, Austin CP, Brooks PJ, Larsson K, Miller Needleman KI, et al. Therapies for rare diseases: therapeutic modalities, progress and challenges ahead. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0049-9>
7. Li C, Mei H, Hu Y. Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy. *Brief Funct Genomics* [Internet]. 2020 Jan 17 [cited 2020 Mar 11]; Available from: <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz042>
8. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. Vol. 293, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2018. p. 10512–23.
9. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. Vol. 293, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2018. p. 10524–35.
10. Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44:113–39.
11. Pawelczak KS, Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Turchi JJ. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2018 Feb 16 [cited 2020 Jan 24];13(2):389–96. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.7b00777>
12. Rouet P, Smih F, Jasin M, P. R, F. S, M. J. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):8096–106.
13. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2002;161(3):1169–75.
14. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for

- genome engineering. Vol. 31, Trends in Biotechnology. 2013. p. 397–405.
15. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2014;15(5):321–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3686>
  16. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2010;11(9):636–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2842>
  17. Chen K-YY, Knoepfler PS. To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells. *Regen Med*. 2016 Dec 1;11(8):801–16.
  18. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [Internet]. Vol. 346, *Science*. 2014 [cited 2019 Dec 9]. p. 1077–88. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
  19. Joung JK, Sander JD. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013 [cited 2019 Dec 27]. p. 49–55. Available from: <http://www.addgene.org/talen>
  20. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* (80- ) [Internet]. 2009 Dec 11;326(5959):1509 LP – 1512. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/326/5959/1509.abstract>
  21. Booher NJ, Bogdanove AJ. Tools for TAL effector design and target prediction. *Methods*. 2014;69(2):121–7.
  22. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429–33.
  23. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria [Internet]. Vol. 36, *Molecular Microbiology*. 2000 [cited 2020 Apr 3]. p. 244–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
  24. Makarova KS, Grishin N V., Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Vol. 1, *Biology Direct*. BioMed Central; 2006. p. 7.
  25. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci*. 2016 Nov;371(1707).
  26. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Vol. 9, *Nature Reviews Microbiology*. NIH Public Access; 2011. p. 467–77.
  27. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. Vol. 4, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. Nature Publishing Group; 2015. p. e264.

28. Zhang JH, Adikaram P, Pandey M, Genis A, Simonds WF. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. Vol. 7, *Bioengineered*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 166–74.
29. Cebrian-Serrano A, Davies B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mamm Genome*. 2017 Jun 20;28(7–8):247–61.
30. AddGene. Addgene CRISPR history [Internet]. Genome engineering. 2016 [cited 2020 May 13]. p. 1. Available from: <https://www.addgene.org/guides/crispr/#pam-table>
31. Wilson LOW, O'Brien AR, Bauer DC. The current state and future of CRISPR-Cas9 gRNA design tools [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Pharmacology*. 2018 [cited 2020 Feb 5]. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
32. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016 Jan 27;6:19675.
33. Malina A, Cameron CJFF, Robert F, Blanchette M, Dostie J, Pelletier J. PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. *Nat Commun*. 2015 Dec 8;6:10124.
34. Zhang G, Dai Z, Dai X. A Novel Hybrid CNN-SVR for CRISPR/Cas9 Guide RNA Activity Prediction. *Front Genet* [Internet]. 2020 [cited 2020 Feb 5];10. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
35. Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, et al. P53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2018 Jul 1;24(7):939–46.
36. Hess GT, Frésard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods*. 2016 Dec 1;13(12):1036–42.
37. Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. Vol. 19, *Nature Reviews Genetics*. 2018. p. 770–88.
38. Wang H, Nakamura M, Abbott TR, Zhao D, Luo K, Yu C, et al. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription. *Science* (80- ). 2019 Sep 20;365(6459):1301–5.
39. Strecker J, Ladha A, Gardner Z, Schmid-Burgk JL, Makarova KS, Koonin E V., et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science* (80- ). 2019 Jul 5;364(6448):48–53.
40. Anzalone A V., Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* [Internet]. 2019 Dec 5 [cited 2020 Jan 29];576(7785):149–57. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
41. Zhang J, Zhao J, Jiang W, Shan X, Yang X, Gao J. Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2012 Jul;13(7):511–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22761243>

42. Malik S, Oyaghire S, Bahal R. Applications of PNA-laden nanoparticles for hematological disorders. Vol. 76, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2019. p. 1057–65.
43. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches [Internet]. Vol. 25, Drug Delivery. 2018 [cited 2020 Feb 9]. p. 1234–57. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
44. Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, Zapatka M, Northcott PA, Schramm K, et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Jun 11;6:7391. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26067104>
45. Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, Scaletti F, Rotello VM. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges. Vol. 15, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2018. p. 905–13.
46. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* [Internet]. 2014/08/06. 2014 Oct 16;514(7522):380–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25119044>
47. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med* [Internet]. 2019/01/28. 2019 Feb;25(2):249–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30692695>
48. Wagner DL, Amini L, Wendering DJ, Burkhardt L-M, Akyüz L, Reinke P, et al. High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat Med* [Internet]. 2018/10/29. 2019 Feb;25(2):242–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30374197>
49. Jacinto F V., Link W, Ferreira BI. CRISPR/Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2020 Feb 25 [cited 2020 Apr 13];jcm.14916. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jcm.14916>
50. Sendra Gisbert L, Miguel Matas A, Sabater Ortí L, Herrero MJ, Sabater Olivas L, Montalvá Orón EM, et al. Efficacy of hydrodynamic interleukin 10 gene transfer in human liver segments with interest in transplantation. *Liver Transplant* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 May 13];23(1):50–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.24667>
51. Le Guen YT, Le Gall T, Midoux P, Guégan P, Braun S, Montier T. Gene transfer to skeletal muscle using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations. *J Gene Med*. 2020 Feb;22(2):e3150.
52. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 1;11(8).
53. Georgomanoli M, Papapetrou EP. Modeling blood diseases with human induced pluripotent stem cells. Vol. 12, *DMM Disease Models and Mechanisms*. Company of Biologists Ltd; 2019.

54. Musunuru K, Sheikh F, Gupta RM, Houser SR, Maher KO, Milan DJ, et al. Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine: A Scientific Statement From the American Heart Association. Vol. 11, *Circulation. Genomic and precision medicine*. NLM (Medline); 2018. p. e000043.
55. Hansel MC, Davila JC, Vosough M, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K, et al. The use of induced pluripotent stem cells for the study and treatment of liver diseases. *Curr Protoc Toxicol*. 2016 Feb 1;2016:14.13.1.
56. Russo FB. Induced pluripotent stem cells for modeling neurological disorders. *World J Transplant*. 2015;5(4):209.
57. Takahashi T. Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2019;59(1):447–62.
58. Strynatka KA, Gurrola-Gal MC, Berman JN, McMaster CR. How surrogate and chemical genetics in model organisms can suggest therapies for human genetic diseases [Internet]. Vol. 208, *Genetics*. 2018 [cited 2020 Feb 10]. p. 833–51. Available from: <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300124>
59. Walsh NC, Kenney LL, Jangalwe S, Aryee K-E, Greiner DL, Brehm MA, et al. Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2017 Jan 24;12(1):187–215.
60. Del Pozo-Rodríguez A, Rodríguez-Gascón A, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Gómez-Aguado I, Battaglia LS, et al. Gene Therapy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2020;171:321–68.
61. Parham JS, Goldberg AC. Mipomersen and its use in familial hypercholesterolemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(2):127–31.
62. Kynamro | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Jun 10]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kynamro>
63. OMIM Entry - # 310200 - MUSCULAR DYSTROPHY, DUCHENNE TYPE; DMD [Internet]. [cited 2020 Mar 27]. Available from: <https://www.omim.org/entry/310200>
64. Cai A, Kong X. Development of CRISPR-Mediated Systems in the Study of Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Gene Ther Methods*. 2019 Jun 1;30(3):71–80.
65. Exondys | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Jun 10]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/exondys>
66. Heo YA. Golodirsen: First Approval [Internet]. Vol. 80, *Drugs. Adis*; 2020 [cited 2020 Apr 6]. p. 329–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-020-01267-2>
67. Informe de Posicionamiento Terapéutico de nusinersen ( Spinraza ® ) en atrofia muscular espinal. 2018 [cited 2020 Mar 31];1–8. Available from: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-nusinersen-Spinraza-atrofia-muscular-espinal.pdf>
68. OMIM Entry - # 253300 - SPINAL MUSCULAR ATROPHY, TYPE I; SMA1.pdf [Internet]. [cited 2020 Mar 31]. Available from:

- <https://omim.org/entry/253300?search=sma 1&highlight=1 sma>
69. Meylemans A, De Bleecker J. Current evidence for treatment with nusinersen for spinal muscular atrophy: a systematic review [Internet]. Vol. 119, *Acta Neurologica Belgica*. 2019 [cited 2020 Mar 31]. p. 523–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13760-019-01199-z>
  70. Hoy SM. Onasemnogene Apeparovvec: First Global Approval. *Drugs* [Internet]. 2019;79(11):1255–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01162-5>
  71. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 6]. Available from: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
  72. Kohn DB, Hershfield MS, Puck JM, Aiuti A, Blincoe A, Gaspar HB, et al. Consensus approach for the management of severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(3):852–63.
  73. Aiuti A, Roncarolo MG, Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*. 2017;9(6):737–40.
  74. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, et al. Inotersen treatment for patients with Hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Jul 5 [cited 2020 Mar 31];379(1):22–31. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1716793>
  75. Agencia Europea de Medicamentos. Anexo I: Ficha tecnica o resumen de las características del producto MEPACT [Internet]. Agencia Europea de Medicamentos. 2018 [cited 2020 Mar 31]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/caelyx-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/caelyx-epar-product-information_es.pdf)
  76. OMIM Entry - # 105210 - AMYLOIDOSIS, HEREDITARY, TRANSTHYRETIN-RELATED [Internet]. [cited 2020 Mar 31]. Available from: <https://www.omim.org/entry/105210>
  77. Mickle K, Lasser KE, Hoch JS, Cipriano LE, Dreitlein WB, Pearson SD. The effectiveness and value of patisiran and inotersen for hereditary transthyretin amyloidosis: A summary from the Institute for Clinical and Economic Review’s Midwest Comparative Effectiveness Public Advisory Council [Internet]. Vol. 25, *Journal of Managed Care and Specialty Pharmacy*. 2019 [cited 2020 Apr 6]. p. 10–5. Available from: [www.jmcp.org](http://www.jmcp.org)
  78. Orphanet: Beta talasemia [Internet]. [cited 2020 Apr 8]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=ES&Expert=848](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=848)
  79. Orphanet: Anemia falciforme [Internet]. [cited 2020 Apr 8]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=ES&Expert=232](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=232)
  80. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med*. 2018;378(16):1479–93.
  81. Orphanet: Amaurosis congénita de Leber [Internet]. [cited 2020 Apr 8]. Available

from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=ES&data\\_id=3243&MISSING\\_CONTENT=Amaurosis-congenita-de-Leber&search=Disease\\_Search\\_Simple&title=Amaurosis cong%20nita de Leber](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=3243&MISSING_CONTENT=Amaurosis-congenita-de-Leber&search=Disease_Search_Simple&title=Amaurosis%20congenita%20de%20Leber)

82. Statement of the DOG, the RG, and the BVA on the therapeutic use of voretigene neparvovec (Luxtorna™) in ophthalmology. English version: January 2019. *Ophthalmologie* [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 8];117:16–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00347-019-0906-2>
83. Maguire AM, Russell S, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, et al. Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation–Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. *Ophthalmology* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 8];126(9):1273–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.06.017>
84. Nguyen CL, Oh LJ, Wong E, Wei J, Chilov M. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Ophthalmol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 6];18(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12886-018-0785-3>
85. Xie X, Zhang Y, Ma W, Shao X, Zhan Y, Mao C, et al. Potent anti-angiogenesis and anti-tumour activity of pegaptanib-loaded tetrahedral DNA nanostructure. *Cell Prolif*. 2019 Sep 1;52(5).
86. Poletto E, Baldo G, Gomez-Ospina N. Genome editing for mucopolysaccharidoses. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
87. Wang D, Zhang F, Gao G. CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors [Internet]. Vol. 181, *Cell*. 2020 [cited 2020 Apr 13]. p. 136–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.023>
88. Zhang HX, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. Vol. 27, *Molecular Therapy*. Cell Press; 2019. p. 735–46.
89. Ryu SM, Koo T, Kim K, Lim K, Baek G, Kim ST, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*. 2018 Jul 1;36(6):536–9.
90. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu MZ, Sui Y, et al. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1495-1507.e15.
91. Cappella M, Ciotti C, Cohen-Tannoudji M, Biferi MG. Gene therapy for ALS-A perspective [Internet]. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 [cited 2020 Apr 6]. Available from: <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>
92. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington’s disease. *J Clin Invest*. 2017 Jun 30;127(7):2719–24.
93. Kepp O, Marabelle A, Zitvogel L, Kroemer G. Oncolysis without viruses — inducing systemic anticancer immune responses with local therapies. *Nat Rev Clin Oncol*

- [Internet]. 2020;17(1):49–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-019-0272-7>
94. Disis ML. Immune regulation of cancer [Internet]. Vol. 28, *Journal of Clinical Oncology*. 2010 [cited 2020 Feb 24]. p. 4531–8. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.27.2146>
  95. Gorbet MJ, Ranjan A. Cancer immunotherapy with immunoadjuvants, nanoparticles, and checkpoint inhibitors: Recent progress and challenges in treatment and tracking response to immunotherapy. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2019;107456. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107456>
  96. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: Future prospects for oncology 11 *Medical and Health Sciences* 1107 *Immunology* 11 *Medical and Health Sciences* 1112 *Oncology and Carcinogenesis*. Vol. 6, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2018.
  97. Liu Y, Dong Y, Kong L, Shi F, Zhu H, Yu J. Abscopal effect of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitors. Vol. 11, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018.
  98. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. Vol. 18, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2018. p. 313–22.
  99. Ingles Garces AH, Au L, Mason R, Thomas J, Larkin J. Building on the anti-PD1/PD-L1 backbone: combination immunotherapy for cancer. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2019;28(8):695–708. Available from: <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1649657>
  100. Moreira RS, Bicker J, Musicco F, Persichetti A, Pereira AMPTPT. Anti-PD-1 immunotherapy in advanced metastatic melanoma: State of the art and future challenges. *Life Sci*. 2020 Jan 1;240:117093.
  101. FDA Approval Timeline of Active Immunotherapies - Cancer Research Institute (CRI) [Internet]. [cited 2020 Feb 25]. Available from: <http://www.cancerresearch.org/scientists/immuno-oncology-landscape/fda-approval-timeline-of-active-immunotherapies>
  102. Van-de-Velde V, Zhou Y. Existing and Emerging Therapies for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Cutan Med Surg*. 2019;23(3):319–27.
  103. Theobald M, Schlag P-M, Senn H-J. Current Immunotherapeutic Strategies in Cancer. Vol. 16, *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2020. 873–900 p.
  104. Salter AI, Pont MJ, Riddell SR. Chimeric antigen receptor-modified T cells: CD19 and the road beyond. Vol. 131, *Blood*. American Society of Hematology; 2018. p. 2621–9.
  105. Xie YJ, Dougan M, Jaiikhani N, Ingram J, Fang T, Kummer L, et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 26];116(16):7624–31. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817147116](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817147116)

106. Bagley SJ, O'Rourke DM. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: Lessons learned and future directions. *Pharmacol Ther.* 2020 Jan 1;205:107419.
107. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges [Internet]. Vol. 19, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2020 [cited 2020 Mar 16]. p. 185–99. Available from: <https://doi.org/10.1038/>
108. Liu E, Marin D, Banerjee P, MacApinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N Engl J Med.* 2020;382(6):545–53.
109. Lerkvaleekul B, Vilaiyuk S. Macrophage activation syndrome: Early diagnosis is key. Vol. 10, *Open Access Rheumatology: Research and Reviews.* Dove Medical Press Ltd; 2018. p. 117–28.
110. Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: A side effect of immunotherapy. Vol. 37, *Immunopharmacology.* Elsevier; 1997. p. 117–32.
111. Song W, Zhang M. Use of CAR-T cell therapy, PD-1 blockade, and their combination for the treatment of hematological malignancies [Internet]. Vol. 214, *Clinical Immunology.* 2020 [cited 2020 Mar 17]. p. 108382. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661619307119>
112. Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med.* 2018 Oct 1;24(10):1499–503.
113. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med.* 2013 Dec 11;5(215).
114. Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jan 26;113(4):E459–68.
115. Ying Z, Huang XF, Xiang X, Liu Y, Kang X, Song Y, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med* [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 18];25(6):947–53. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0421-7>
116. Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res.* 2014 Jan 1;74(1):93–102.
117. Zah E, Lin MY, Anne SB, Jensen MC, Chen YY. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res.* 2016 Jun 1;4(6):498–508.
118. Lanitis E, Poussin M, Klattenhoff AW, Song D, Sandaltzopoulos R, June CH, et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res.* 2013 Jul 1;1(1):43–53.
119. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. Vol. 2, *Nature Biomedical Engineering.* Nature Publishing Group; 2018. p. 377–91.

120. Cooper ML, Choi J, Staser K, Ritchey JK, Devenport JM, Eckardt K, et al. An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*. 2018 Sep 1;32(9):1970–83.
121. Diaconu I, Ballard B, Zhang M, Chen Y, West J, Dotti G, et al. Inducible Caspase-9 Selectively Modulates the Toxicities of CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells. *Mol Ther*. 2017 Mar 1;25(3):580–92.
122. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010 Jun 29;24(6):1160–70.
123. Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Of CARs and TRUCKs: Chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev*. 2014;257(1):83–90.
124. Kunert A, Chmielewski M, Wijers R, Berrevoets C, Abken H, Debets R. Intra-tumoral production of IL18, but not IL12, by TCR-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017 Sep 28 [cited 2020 Apr 9];7(1):e1378842. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2017.1378842>
125. Sterner RM, Cox MJ, Sakemura R, Kenderian SS. Using crispr/cas9 to knock out gm-csf in car-t cells. *J Vis Exp*. 2019 Jul 1;2019(149):e59629.
126. Chang ZL, Lorenzini MH, Chen X, Tran U, Bangayan NJ, Chen YY. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors. *Nat Chem Biol*. 2018 Mar 1;14(3):317–24.
127. Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF- $\beta$  Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1855–66.
128. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017 Feb 9;8(10):17002–11.
129. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, Van Der Stegen SJC, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* [Internet]. 2017 [cited 2020 Mar 24];543(7643):113–7. Available from: [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).
130. Li S, Siriwon N, Zhang X, Yang S, Jin T, He F, et al. Enhanced cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor–modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2017 Nov 15;23(22):6982–92.
131. Hale M, Lee B, Honaker Y, Leung WH, Grier AE, Jacobs HM, et al. Homology-Directed Recombination for Enhanced Engineering of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2017 Mar 17;4:192–203.
132. Ligtenberg MA, Mougiakakos D, Mukhopadhyay M, Witt K, Lladser A, Chmielewski M, et al. Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor–Redirected T Cells

as well as Bystander Cells from Oxidative Stress–Induced Loss of Antitumor Activity. *J Immunol.* 2016 Jan 15;196(2):759–66.

133. Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E, et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell.* 2016 Oct 6;167(2):405–418.e13.
134. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, et al. A chimeric switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second-generation CAR T cells in advanced solid tumors. *Cancer Res.* 2016 Mar 15;76(6):1578–90.
135. Perna SK, Pagliara D, Mahendravada A, Liu H, Brenner MK, Savoldo B, et al. Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirection cytotoxic T lymphocytes (CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition. *Clin Cancer Res.* 2014 Jan 1;20(1):131–9.
136. Mohammed S, Sukumaran S, Bajgain P, Watanabe N, Heslop HE, Rooney CM, et al. Improving Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cell Function by Reversing the Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Mol Ther.* 2017 Jan 4;25(1):249–58.
137. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirection T lymphocytes. *Nat Med.* 2015 May 1;21(5):524–9.
138. Wei J, Luo C, Wang Y, Guo Y, Dai H, Tong C, et al. PD-1 silencing impairs the anti-tumor function of chimeric antigen receptor modified T cells by inhibiting proliferation activity. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 18];7(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0685-y>
139. Slaney CY, Von Scheidt B, Davenport AJ, Beavis PA, Westwood JA, Mardiana S, et al. Dual-specific chimeric antigen receptor T cells and an indirect vaccine eradicate a variety of large solid tumors in an immunocompetent, self-antigen setting. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 [cited 2020 Mar 20];23(10):2478–90. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
140. Liu J, Zhou G, Zhang L, Zhao Q. Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. 2019 [cited 2020 Apr 8]. p. 456. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
141. Salas-Mckee J, Kong W, Gladney WL, Jadowsky JK, Plesa G, Davis MM, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the era of CAR T cell immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother.* 2019 May 4;15(5):1126–32.
142. Mollanoori H, Shahraki H, Rahmati Y, Teimourian S. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. Vol. 79, *Human Immunology*. Elsevier Inc.; 2018. p. 876–82.