

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



Edición genética aplicada a la terapia celular del cáncer:
Uso de CRISPR/Cas en la inmunoterapia con linfocitos
infiltrantes de tumor (TILs) y linfocitos T con receptor de
antígeno quimérico (CAR-T)

Giráldez Martínez, Martín

Tutor: Dr. Ángel María Carracedo Álvarez

Cotutora: Dra. Catarina Allegue Toscano

Departamento: Medicina Xenómica

Curso: 2020-2021

Convocatoria: Primeira

Índice

Abreviaciones.....	3
Resumen.....	4
Objetivos y metodología	5
Introducción a la edición genómica	6
Sistema CRISPR/Cas.....	8
Aspectos históricos.....	8
Aspectos técnicos.....	9
CRISPR-Cas como herramienta de edición genética.	12
Limitaciones y retos del sistema CRISPR/Cas.....	14
Inmunoterapia.....	16
CAR-T.....	18
CAR-T aprobados.....	19
Efectos adversos.....	20
El papel de la edición CRISPR en la mejora de las terapias CAR-T	21
Linfocitos Infiltrantes de Tumor.....	27
Efectos adversos.....	29
El papel de la edición CRISPR en la mejora de la terapia con TILs	29
Nuevas estrategias en la terapia celular	32
Reflexión personal desde el punto de vista clínico	33
Conclusión.....	34
Referencias.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la HDR y la NHEJ	7
Figura 2. Estructura y función del sistema CRISPR-Cas	9
Figura 3. Esquema de las etapas del sistema CRISPR	11
Figura 4. DSB mediada por el complejo gRNA/Cas9	12
Figura 5. Efectos off-target	15
Figura 6. Aplicaciones de CRISPR en la inmunoterapia y sobre la célula tumoral	17
Figura 7. Estructura y evolución de los CAR	18
Figura 8. Limitaciones de la terapia CAR-T	21
Figura 9. Análisis de la supervivencia con la inserción del CAR en el locus TRAC	22
Figura 10. Análisis de supervivencia con CAR TCR/HLA-1 negativo	23
Figura 11. K.O. de TRAC y PD1	23
Figura 12. Análisis de supervivencia con CAR-T EGFRvIII delta PD1	24
Figura 13. Análisis de supervivencia con CAR-T CD19 K.O. GM-CSF	25
Figura 14. Pasos en la terapia con linfocitos infiltrantes de tumor	28
Figura 15. Eliminación dirigida de Gata3 y tamaño tumoral	30
Figura 16. Enfermedades, intervenciones y fases del ensayo clínico con TILs	31
Figura 17. Índice de fagocitosis	33

Índice de tablas

Tabla 1 Estrategias con CRISPR para mejorar la terapia CAR-T	25
Tabla 2 Ensayos clínicos con CRISPR para la obtención de CAR-T universales	26

Abreviaciones

- Cas: *CRISPR associated (gene)*
- CAR: *chimeric antigen receptor*
- crRNA: *CRISPR RNA*
- CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- CRS: *cytokine release syndrome*
- EMA: *European Medicine Agency*
- FDA: *Food and Drug Administration*
- HDR: *homology directed repair*
- NHEJ: *non homologous end joining*
- pegRNA: *prime editing guide RNA*
- TILs: *tumor infiltrating lymphocytes*
- TALENs: *transcription activatorlike effector nucleases*
- tracrRNA: *trans-activating CRISPR RNA*
- MHC: *Major histocompatibility complex*
- dsDNA: *double-stranded DNA*
- PAM: *protospacer adjacent motifs*
- ZFNs: *Zinc-finger nucleases*
- KI: *knockin*
- KO: *knockout*
- TCR: *T cell receptor*
- CPP: *cell penetrating peptides*
- LNP: *lipids nanoparticles*
- WT: *wild type*
- TAMs: *tumor associated macrophages*
- TEM: *tumor microenvironment*
- gRNA: *guide RNA*
- dCas9: *dead Cas9*
- DSB: *double-strand break*
- SNP: *single nucleotide polymorphism*

Resumen

La edición genética aplicada a la inmunoterapia celular del cáncer es un potente campo de investigación hoy en día, gracias en gran parte a las herramientas basadas en el sistema CRISPR/Cas, que permite una edición sencilla y eficaz, en múltiples genes a la vez. El salto de estas terapias del laboratorio a la clínica está cada día más cerca, y en el caso de los linfocitos con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) ya es una realidad, aunque aún quedan importantes pasos en el camino hacia la optimización de esta nueva arma contra el cáncer.

En este trabajo, veremos cómo funciona el sistema CRISPR/Cas, así como la terapia celular con CAR-T y con linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), y el papel que en ellas desempeña la edición genética mediada por la herramienta previamente mencionada, para finalizar con la última novedad de la terapia celular contra el cáncer. La búsqueda documental bibliográfica se complementó con la asistencia a *journal clubs*, sesiones de discusión de los proyectos de la Unidad de Edición Genómica del grupo de Medicina Xenómica y asistencia puntual a los laboratorios del CIMUS.

Gene editing applied to cancer cell immunotherapy is a powerful field of research today, thanks in large part to tools based on the CRISPR/Cas system, which allows simple and efficient editing, in multiple genes at the same time. The leap of these therapies from the laboratory to the clinic is closer every day, and in the case of lymphocytes with chimeric antigen receptor (CAR-T) it is already a reality, although there are still important steps on the road to optimization of this new weapon against cancer.

In this work, we will see how the CRISPR/Cas system works, as well as cell therapy with CAR-T and tumor infiltrating lymphocytes (TILs), and the role that gene editing mediated by the previously mentioned tool plays in them, to end with the latest novelty in cell therapy against cancer. The bibliographic documentary search was complemented with attendance at journal clubs, discussion sessions of the projects of the Genomic Editing Unit of the Xenomic Medicine group, and punctual attendance at the CIMUS laboratories.

A edición de xenes aplicada á inmunoterapia con células cancerosas é hoxe un poderoso campo de investigación, grazas en gran parte a ferramentas baseadas no sistema CRISPR/Cas, que permite a edición sinxela e eficiente, en múltiples xenes ao mesmo tempo. O salto destas terapias do laboratorio á clínica está cada día máis preto e no caso dos linfocitos con receptor de antíxeno quimérico (CAR-T) xa é unha realidade, aínda que aínda hai pasos importantes no camiño para optimizar esta nova arma contra o cancro.

Neste traballo veremos como funciona o sistema CRISPR/Cas, así como a terapia celular con CAR-T e linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) e o papel que xoga neles a edición de xenes mediada pola ferramenta mencionada anteriormente, para rematar coa última novidade da terapia celular contra o cancro. A busca documental bibliográfica complementouse coa asistencia a *journal clubs*, sesións de debate dos proxectos da Unidade de Edición Xenómica do grupo de Medicina Xenómica e asistencia puntual aos laboratorios do CIMUS.

Objetivos y metodología

El objetivo de este trabajo es revisar diferentes estrategias que se están desarrollando en el campo de la terapia celular, en concreto con linfocitos de la estirpe T, basadas en la edición genética mediada por el sistema CRISPR/Cas. Se hablará de la investigación con CAR-T, sus efectos secundarios, limitaciones, y posibles estrategias para mejorar esta terapia, como la obtención de linfocitos universales o más resistentes a la regulación negativa que ejerce el tumor sobre ellos. De igual modo se aborda la otra terapia con linfocitos T: los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Al final del trabajo se mencionan nuevas estrategias con estirpes celulares diferentes a los linfocitos, así como una reflexión personal desde el punto de vista más clínico.

La información se obtuvo de la base de datos *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), de diversos artículos científicos proporcionados por miembros del equipo del CIMUS, la web de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (<https://www.ema.europa.eu/en>), la de la *Food and Drug Administration* (FDA) (<https://www.fda.gov/>), así como el registro de ensayos clínicos *ClinicalTrials* (<https://clinicaltrials.gov/>). La búsqueda fue guiada tratando de incorporar publicaciones lo más recientes posibles, con el objetivo de mostrar lo último en este campo.

Introducción a la edición genómica

El popular sistema CRISPR / Cas permite la ingeniería de precisión sobre el genoma al inducir una ruptura de doble hebra en el DNA (*Double strand break*, DSB) específicamente en el sitio que buscamos dentro del genoma. La DSB se repara mediante vías de reparación de DNA endógenas, ya sea mediante la unión de extremos no homólogos (*NonHomologous End Joining*, NHEJ) o reparación dirigida por homología (*Homologous Directed Repair*, HDR) (1).

Nos fijaremos un poco más en estas dos vías principales de reparación antes de entrar en detalle con la CRISPR/Cas.

- NHEJ: es la vía de reparación de rotura de doble hebra predominante a lo largo del ciclo celular y representa casi toda la reparación de DSB fuera de las fases S y G2.

NHEJ se basa en la proteína Ku para enhebrarse en los extremos del DNA y así mejorar la afinidad de los componentes enzimáticos del NHEJ que consisten en polimerasas (*Pol μ* y *Pol λ*), una nucleasa (el complejo *Artemis · DNA-PKcs*) y una ligasa (*XLF · XRCC4 · Complejo Lig4*). Cada uno de los componentes enzimáticos se distingue por su versatilidad al actuar en diversas configuraciones de extremos de DNA incompatibles junto con una flexibilidad en el orden de carga, lo que da lugar a muchos resultados de unión posibles de una DSB. Los extremos del DNA pueden ligarse directamente o, si los extremos son incompatibles, procesarse hasta que se logre una configuración ligable que a menudo se estabiliza con hasta 4 pb de microhomología terminal. El procesamiento de extremos de DNA da como resultado la pérdida o adición de nucleótidos, lo que explica por qué las DSB reparadas por NHEJ rara vez se restauran a su secuencia de DNA original. Por lo tanto, NHEJ es una vía con múltiples enzimas a su disposición para reparar las DSB, lo que conlleva una diversidad de resultados de reparación, como por ejemplo la producción de microdeleciones o microinserciones, que pueden alterar el marco de lectura (2).

- HDR: Se trata de una reparación que emplea un molde homólogo como base para arreglar la ruptura de la doble hebra de DNA. Esta secuencia que sirve de guía suele provenir de la cromátida hermana, y por eso este tipo de reparación acontece en las fases S y G2 del ciclo celular.

Al principio, actúa sobre la secuencia el complejo MRN (*Mre11-Rad50-Nbs1*), que produce una resección en uno de los hilos de los extremos de la ruptura, convirtiéndolos en cohesivos. Luego se une la proteína RPA (*Replication Protein A*), lo que a su vez permite la participación de otras (como *RAD51* o *BRCA*) y se cataliza una estructura filamentosa en el extremo. Esto conlleva la invasión de una doble hebra de DNA que se estabiliza en un bucle D (*D-loop formation*) en presencia de un alto nivel de homología, un proceso que conduce a la formación de un heterodímero. La secuencia homóloga dirigirá la síntesis de la cadena cortada, que posteriormente se estabilizará mediante ligasas, lo que resultará en la reparación del daño (3).

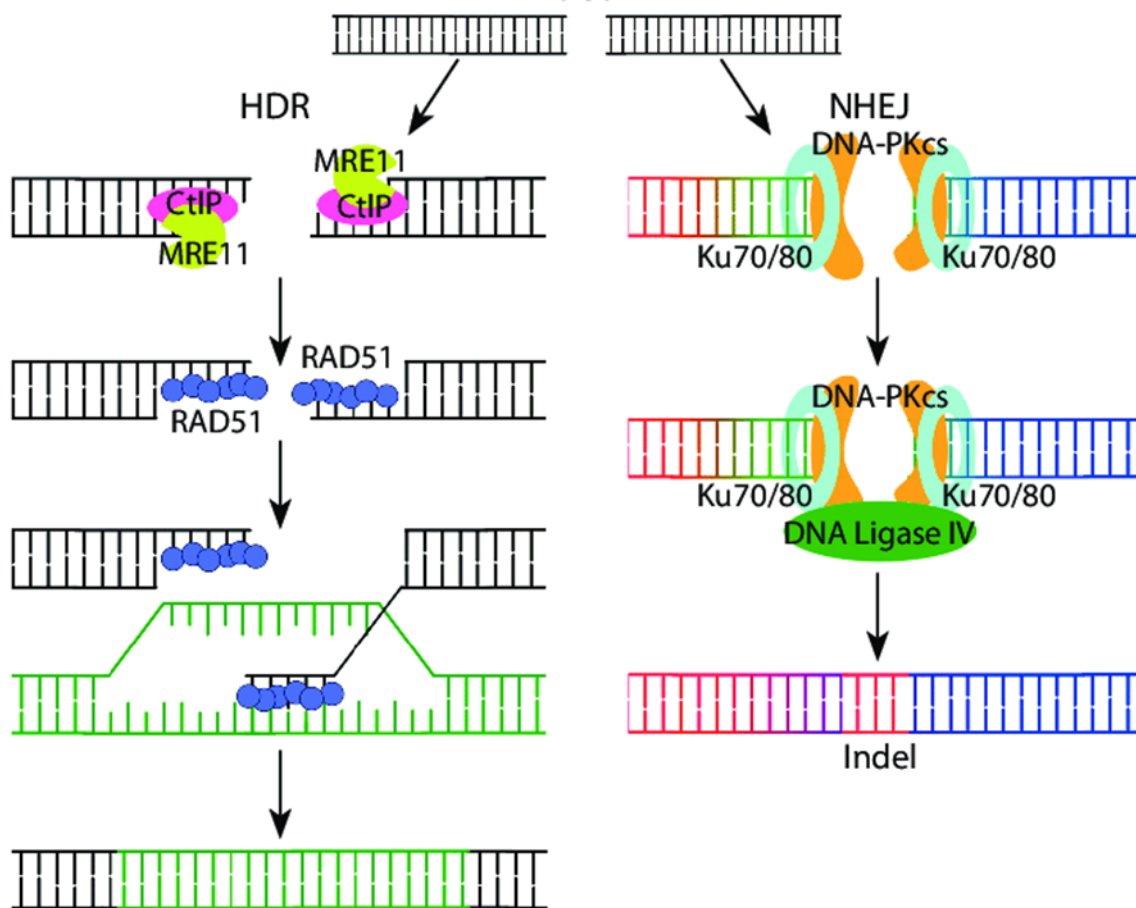


Figura 1. Esquema de la HDR y la NHEJ

Figura 1. Esquema de la HDR y la NHEJ. En el caso de la HDR (izquierda en la imagen), vemos representadas diferentes complejos proteicos que intervienen en la reparación, como el MRE11 o el RAD51, así como el molde de DNA sobre el que se realiza la reparación. A la derecha de la imagen tenemos la NHEJ, donde también se representan diferentes proteínas (polimerasas, nucleasas, ligasas) que llevan a la reparación de la doble hebra generando en el proceso un indel, una delección o una incorporación de un nucleótido en la secuencia. Imagen tomada de (4).

Estos métodos de reparación son clave cuando hablamos de edición genética, no solo con CRISPR/Cas, si no que en otras técnicas también, como los dedos de Zinc o las TALENs (Transcription activator-like effector nuclease).

La NHEJ tiende a producir cambios en el marco de lectura de un gen, con la incorporación o la delección de un solo nucleótido ya se alteran los codones (agrupación de tres nucleótidos, que codifican normalmente para un aminoácido) a partir de ese nucleótido, y esto conlleva una alta probabilidad de que se genere un codón de parada, lo que no permitiría que continuase la transcripción de ese gen, dando lugar a la no expresión de lo que codificaba ese gen. Es decir, que cuando una célula usa este método de reparación, facilita la generación de un KnockOut (KO), esto es, una modificación en la célula que hace que pierda la expresión de un gen.

Por otra parte, tenemos la HDR, la cual nos permite introducir nuevo material genético en una región concreta si suministramos un fragmento de DNA homólogo en la rotura que producimos. Para ello, las células necesitan estar en unas fases concretas del ciclo celular como mencionamos previamente (S y G2) para poder llevar a cabo esta reparación. Regular qué método de reparación emplea la célula según nos interese sería muy interesante (5).

Sistema CRISPR/Cas

Aspectos históricos

Veamos cómo fueron los orígenes de esta técnica y su evolución (apenas 30 años desde su descubrimiento).

El primer antecedente del sistema CRISPR se remonta a 1987, cuando se publicó el primer artículo que hacía mención a la existencia de secuencias repetidas en el genoma bacteriano, en concreto en *Escherichia Coli* (6). Inicialmente se consideró que tales secuencias carecían de función. Posteriormente, en el año 1993, el investigador español Francisco Martínez Mojica, describió secuencias con una estructura similar en las arqueas *Haloferax mediterranei* (7), que habitan exclusivamente en las salinas de Santa Pola (Alicante), y dos años después (1995) publicó otro artículo reportando su presencia también en *Haloferax volcanii* (8). En este segundo artículo se describían dichas secuencias como fragmentos de 30 pb (pares de bases) con simetría de díadas que se repetían en tándem, intercaladas con secuencias únicas de 33-39 pb y se las denominaba TREPs (por *tándem repeats*). Posteriormente pasaron a denominarse “repeticiones cortas regularmente espaciadas” (SRSRs por sus siglas en inglés: *short regularly spaced repeats*) y en el año 2000 Mojica ya había encontrado estas secuencias en 20 microorganismos diferentes (9). Dos años más tarde, Ruud Jansen identificó genes que estaban asociados a estas secuencias, los genes *cas* (*CRISPR-associated*) que codifican para las proteínas Cas, y de común acuerdo con Mojica, decidieron utilizar en adelante el nombre que actualmente conocemos: CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* / repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interesparadas con regularidad) (10). Fue en 2005 cuando tres laboratorios independientes, entre ellos el de Mojica, dilucidaron la función biológica del sistema CRISPR, al identificar similitudes entre los espaciadores asociados a CRISPR y el genoma de ciertos virus que infectan a bacterias, deduciendo así que CRISPR podría ser un sistema de defensa frente a virus (11, 12, 13). Estos descubrimientos sentaron las bases para el posterior desarrollo de la técnica de edición genética.

Tras el descubrimiento de 2005, se sucedieron toda una serie de investigaciones que fueron esclareciendo y ratificando la función y el modo de acción de este sistema defensivo inmune adaptativo natural con memoria (14). Finalmente, en el año 2012, Doudna y Charpentier utilizaron el sistema CRISPR para cortar ADN de forma dirigida *in vitro* y demostraron que los dos RNA necesarios para la función de Cas9 (crRNA y tracrRNA) podían unirse en un único ARN guía (sgRNA) (15). Su artículo fue el primero en el que se reconocía el potencial de CRISPR para ser utilizado en edición genética, y a partir de ahí vinieron nuevos avances de interés biotecnológico y biomédico (16). El descubrimiento de la aplicación de este sistema como herramienta de edición genética les valió el premio Nobel de Química 2020 a estas dos investigadoras.

Aspectos técnicos

El sistema funciona de tal modo que los fragmentos de DNA viral que se transfieren a las bacterias y arqueas quedan insertados en su genoma tras el primer contacto de éstas con el patógeno, de forma que en un posible contacto en el futuro con un virus similar la bacteria reconoce el DNA invasor y lo ataca (16).

Existen varios tipos de CRISPR con secuencias variables y que dependen de diferentes proteínas Cas, aunque todos comparten una actividad similar codificada por DNA y mediada por RNA. El locus CRISPR se compone de secuencias de repetición cortas, que oscilan normalmente entre 28 y 37 pb, separadas por espaciadores, cada uno con una secuencia única de longitud similar. Cada repetición es dispuesta de manera palindrómica, lo que significa que la secuencia de repetición en un lado de la hebra es idéntica a la secuencia de la hebra opuesta cuando ambas se leen en sus respectivas direcciones 5' a 3'. Las secuencias espaciadoras presentan material genético derivado de fagos o plásmidos virales, que constituyen los elementos clave de la especificidad de los mecanismos de defensa de CRISPR (17).

Una región rica en adenina y timina, conocida como secuencia líder, está upstream (algo así como río arriba) del locus CRISPR. Esta secuencia líder tiene una longitud de aproximadamente 500 pb, lleva elementos promotores así como señales que intervienen en la adaptación de los sistemas CRISPR, siendo cruciales para la transcripción de crRNA (CRISPR RNA) y la integración exitosa de material genético extraño en las secuencias CRISPR (18).

La formación CRISPR y la secuencia líder están precedidas por genes asociados a CRISPR, los genes Cas, que sintetizan las proteínas Cas, las cuales se emparejan con el crRNA transcrito desde el loci CRISPR, formando los complejos efectores CRISPR-Cas que median el silenciamiento y la escisión de ácidos nucleicos extraños. Debido a las variaciones en los genes Cas y las diferentes combinaciones de locus CRISPR, existen varios tipos de sistemas CRISPR-Cas. Los estudios más recientes hablan de dos clases y seis tipos de sistemas. Los sistemas de clase 1 incluyen los tipos I, III y IV, que dependen de complejos constituidos por crRNA multiproteicos para ejecutar su función; los sistemas de clase 2 abarcan los tipos II, V y VI, cuyo complejo efector está compuesto por una única proteína multidominio. (19)

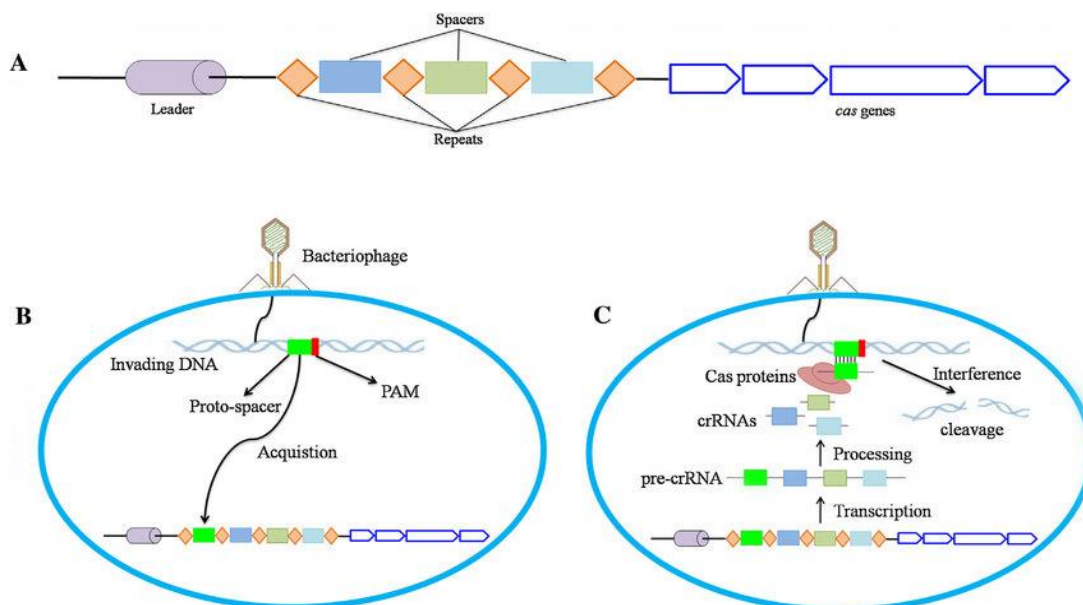


Figura 2. Estructura y función del sistema CRISPR-Cas

Figura 2. Estructura y función del sistema CRISPR-Cas. (A) La estructura típica de un locus CRISPR. (B) Adquisición de un nuevo espaciador derivado de un bacteriófago. Al invadir un bacteriófago por primera vez, se incorporaron un nuevo espaciador derivado del DNA invasor y una repetición en el locus CRISPR. (C) El mecanismo inmunológico del sistema CRISPR-Cas resistió la invasión del DNA. Cuando el mismo bacteriófago invadió nuevamente, el locus CRISPR pudo transcribirse en un pre-crRNA largo que se procesó y generó pequeños crRNA. El crRNA específico sirvió como guía para las proteínas Cas que reconocieron y escindieron el DNA invasor. (20)

El sistema CRISPR actúa en tres etapas: adaptación, biogénesis del CRISPR RNA (crRNA) y por último la interferencia. Veamos en qué consisten estas fases.

Adaptación:

La adaptación o adquisición es el primer paso. En esta fase, el material genético del fago invasor se incorpora al sistema CRISPR-Cas, proporcionando así al organismo una forma de reconocer y ajustar su respuesta si en el futuro se producen invasiones por esa cepa de fagos en particular. Cas1 y Cas2 son las proteínas clave que median la adaptación, y son ubicuas en los sistemas CRISPR-Cas, independientemente del tipo (21). Ambas proteínas son necesarias para este paso, ya que la expresión aislada de Cas1 no potencia la adquisición del espaciador, y lo mismo ocurre si se expresa Cas2 por si sola. (22)

El complejo Cas1-Cas2 juega un doble papel en la adaptación, por un lado participa en la escisión del protoespaciador (segmento presente en la molécula de DNA extraño que precede a la secuencia espaciadora) y por otro interviene en la incorporación de este segmento a la secuencia CRISPR (23).

La selección de secuencias de protoespaciadores parece estar mediada por motivos cortos situados cerca de la secuencia diana, y se denominan motivos adyacentes a los protoespaciadores (*protospacer adjacent motifs* o PAM). Los PAM son secuencias cortas (de 2 a 5 nucleótidos), específicos para cada subtipo de CRISPR-Cas y bacteria, que determinan la posición del espaciador dentro de la matriz CRISPR en los sistemas de tipo I y II, los modelos mejor entendidos en esta fase de adaptación (24). En los sistemas de tipo I, Cas1 se une a la secuencia complementaria de PAM en su forma de ssDNA (*single-stranded DNA*, o DNA monocatenario). En cuanto a los sistemas de tipo II, Cas9 reconoce la secuencia PAM en forma de doble hebra (*double-stranded DNA* o dsDNA) (25). Además, Los PAM parecen participar en la fase de interferencia y también en la distinción entre el material genético propio y el ajeno (26). Finalmente, la actividad integradora del complejo Cas1-Cas2 media la integración del DNA protoespaciador en la matriz CRISPR.

Biogénesis del RNA CRISPR:

La transcripción y procesamiento de la matriz CRISPR en pequeños crRNA implica procesos y enzimas específicos que difieren entre los diferentes subtipos (sobre los cuales no entraremos en profundidad). En todos ellos, el locus CRISPR es transcrito en un precursor de crRNA (pre-crRNA), que posteriormente es escindido y procesado por proteínas Cas o ribonucleasas celulares, produciendo unidades más pequeñas de crRNA maduro (27). Este crRNA maduro unido a una proteína Cas forman el complejo efectivo que lleva a cabo la siguiente fase, la interferencia.

Interferencia:

Tras la infección, las moléculas maduras de crRNA dirigen la maquinaria de interferencia específica de cada subtipo hacia ácidos nucleicos invasores para llevar a cabo el silenciamiento del material genético foráneo. Este es el objetivo, y cada subtipo lo lleva a cabo con una maquinaria distinta, pero en esencia se basa en reconocer por complementariedad el DNA extraño mediante el crRNA y destruirlo gracias a la actividad catalasa de las proteínas Cas (28).

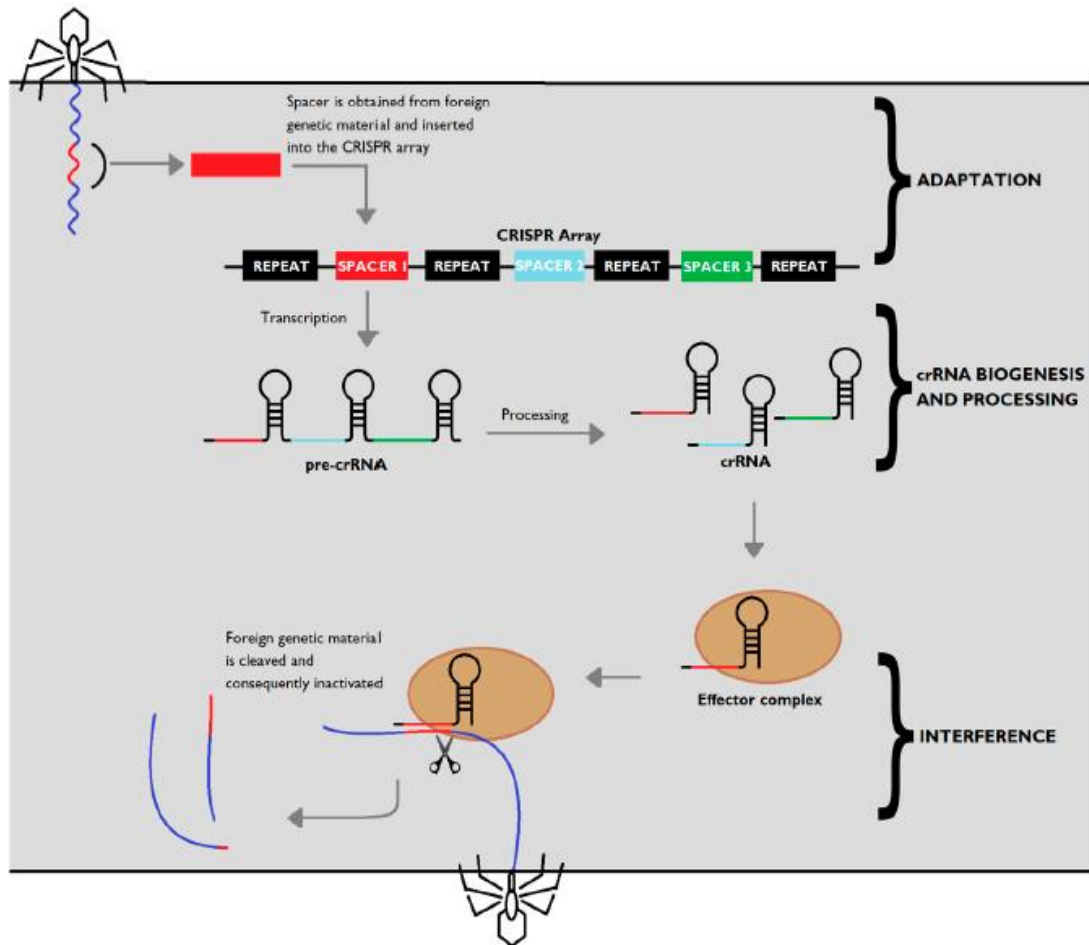


Figura 3. Esquema de las etapas del sistema CRISPR

Figura 3. Esquema de las etapas del sistema CRISPR. El DNA invasor es procesado e integrado en la matriz de CRISPR, y al producirse una nueva invasión es transcrito y madurado a crRNA, que unido a la proteína Cas (en marrón) actúan como sistema de defensa degradando el material genético extraño, protegiendo a la bacteria de la nueva invasión (28).

CRISPR-Cas como herramienta de edición genética.

Ahora veremos la aplicación del sistema CRISPR-Cas como método de edición genética, sus ventajas e inconvenientes.

De ambas clases CRISPR-Cas, los sistemas de clase 2 son los más extendidos entre la comunidad científica debido a la simplicidad de su mecanismo. Mientras que los sistemas de clase 1 requieren un complicado complejo multiproteico en cascada, los sistemas de clase 2 dependen solo de pequeñas moléculas de RNA, aparte de la proteína Cas específica del tipo.

Concretamente el tipo II, depende de la proteína Cas9 y de moléculas de RNA trans-activantes (*trans-activating RNA molecules* o tracrRNA), las cuales se emparejan a los crRNA mediante complementariedad, originando un complejo de RNA dual (tracrRNA:crRNA). La unión de este complejo con Cas9 induce cambios conformacionales en esta proteína, que conllevan su activación catalítica. De este modo, ya tenemos una estructura que localiza una secuencia concreta (el RNA dual) y una estructura que produce una rotura en el material genético (Cas9) (29).

Jinek y colaboradores, en 2012, desarrollaron la siguiente hipótesis, la cual se demostró que era posible y supuso una gran revolución en el mundo de la edición genética: en el sistema tipo II, el complejo de ARN de doble guía tracrRNA:crRNA de Cas9 podría fusionarse en un solo RNA quimérico uniendo el extremo 3' del crRNA al extremo 5' del tracrRNA. Esta técnica permitiría la escisión programada del DNA mediante la creación del RNA quimérico específico del DNA objetivo, posteriormente designada como sgRNA o gRNA (RNA guía) (30).

Gracias a la homología entre el gRNA y la secuencia objetivo, y la actividad catalítica de Cas9 se produce una rotura de doble hebra (*double-strand break* o DSB) en el DNA.

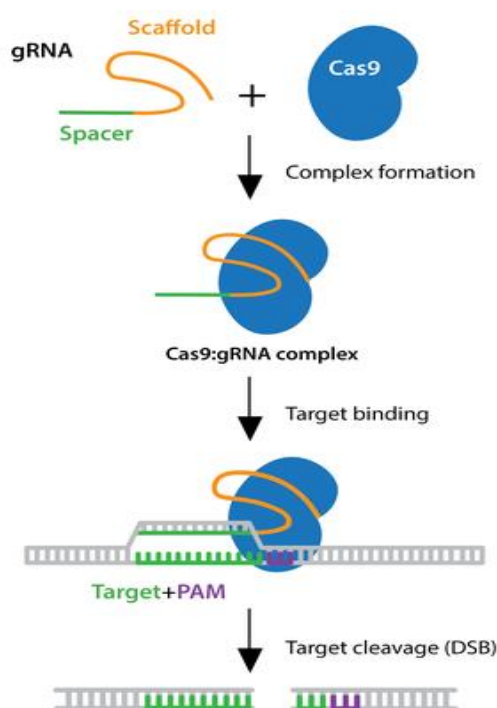


Figura 4. DSB mediada por el complejo gRNA/Cas9

Figura 4. Representación de la rotura de doble hebra mediada por el complejo gRNA/Cas9. Imagen adaptada de addgene-CRISPR guide (<https://www.addgene.org/guides/crispr/>).

La reparación de la DSB es llevada a cabo por los mecanismos que vimos al principio del trabajo: ya sea mediante la unión de extremos no homólogos (*NonHomologous End Joining*, NHEJ) o reparación dirigida por homología (*Homologous Directed Repair*, HDR).

La NHEJ no necesita una secuencia molde para llevar a cabo la reparación y puede producir pequeñas inserciones o deleciones, lo que podría alterar el marco de lectura, produciendo normalmente un codón de stop prematuro, llevando a la no expresión del gen (KnockOut, KO). NHEJ es un proceso aleatorio e impredecible no apto para la edición de una única base o la inserción de secuencias específicas (2).

La HDR es un método más preciso en la reparación de la DSB y en la incorporación de secuencias específicas después de la escisión de Cas9. Al contrario que la NHEJ, la HDR requiere una plantilla de ADN que contiene la secuencia que se entregará a la célula como molde sobre el que reparará la DSB. El problema es que este tipo de reparación solo tiene lugar en las fases S y G2 del ciclo celular (3).

Además de las mutaciones y la edición de genes, los sistemas CRISPR también se han manipulado para aumentar o reducir la expresión genética. Al introducir dos mutaciones en los dominios catalíticos RuvC y HNH de Cas9, los científicos diseñaron una Cas9 "muerta" (*dead Cas9* o dCas9) que tiene la capacidad de unirse al DNA pero no tiene actividad catalítica, no lo corta. La represión es posible usando dCas9 unida a moléculas de gRNA complementarias a una región genética seleccionada. La unión al gen objetivo impide la transcripción, aparentemente por inhibir estéricamente la unión y la actividad de la RNA polimerasa (RNAP). Además, tanto la iniciación y los pasos de elongación de la transcripción pueden prevenirse mediante este método, dependiendo de la región del gen hacia la que se dirige dCas9 (31).

Las modificaciones de la expresión génica (podemos aumentarla o disminuirla) causadas por dCas9 son transitorias, ya que el DNA genómico no está alterado, sin embargo, se pueden lograr modificaciones persistentes con dCas9 fusionándola con acetiltransferasas, desmetilasas de histonas/DNA o metiltransferasas, que alteran la acetilación/metilación de histonas o del DNA e inducen la modulación de la expresión epigenética potencialmente hereditaria cuando el objetivo son células en división (32).

Introducción del sistema CRISPR/Cas en el interior de las células

Se han desarrollado y empleado diferentes técnicas para la introducción del sistema en las células objetivo.

Por ejemplo, métodos físicos como la microinyección o la electroporación mostraron resultados exitosos, sin embargo, la microinyección es un método intrusivo que puede dañar las células y requiere la inyección individual de cada célula, lo cual es muy laborioso. Además, ambas técnicas sólo son adecuadas para el uso *in vitro* (33).

Los vectores virales son un medio versátil de administración con diversas prácticas *in vitro* e *in vivo*, en función del vector elegido. Por ejemplo, los vectores virales adenoasociados (*adeno-associated viral*, AAV) se han utilizado en un sistema de casete doble como una forma de administrar hasta tres gRNA incorporados en un plásmido a la misma célula para estudiar la función

genética in vivo mediante la edición de múltiples genes o para crear modelos de enfermedades (34). El cribado de la función genética en el genoma es otro uso de los vectores virales, a través de bibliotecas generadas por el uso de lentivirus de gRNA (35). Los vectores virales son uno de los principales métodos de introducción usados en ensayos clínicos, aunque su utilidad y gran eficacia pueden verse obstaculizadas por diversos factores, como la inmunogenicidad, la limitada capacidad de inserción (en el caso de los AAV), carcinogénesis (principalmente lenti- y retrovirus), y efectos fuera del objetivo (lentivirus) (36, 37).

Recientemente se han desarrollado nuevos mecanismos que han mostrado resultados prometedores como alternativas adecuadas a los virus y métodos físicos, como por ejemplo los péptidos penetrantes de células (*cell-penetrating peptides*, CPP) conjugados con Cas9 y en complejo con el gRNA (38), nanopartículas de oro y arginina catiónica (ArgNPs) con sistemas Cas9 (39), o nanopartículas lipídicas (*lipids nanoparticles*, LNP) (40).

Limitaciones y retos del sistema CRISPR/Cas

A pesar de las cualidades de los sistemas CRISPR, es necesario tener en cuenta algunas limitaciones de CRISPR para su empleo en aplicaciones terapéuticas y clínicas a mayor escala.

Los sistemas CRISPR-Cas requieren una secuencia PAM corta junto al extremo 3' de la secuencia objetivo. Esta característica limita su uso cuando tal PAM no existe en la vecindad del locus sobre el que se desea actuar. Sin embargo, las secuencias que forman los PAM son muy comunes en el genoma, y tenemos acceso a múltiples Cas9 de diferentes bacterias con una gran variedad de PAM, solo hay que elegir la que mejor nos venga según nuestra necesidad (26).

Uno de los obstáculos más importantes del sistema CRISPR es su propensión de generar efectos fuera del objetivo (*off-target effects*). Si bien los objetivos de TALEN pueden tener una longitud de 30 nt, lo que los convierte en destinos únicos en el genoma y reducir la posibilidad de desajustes, Cas9 está guiada por una fracción de 20 nt del gRNA, y mantiene la actividad de escisión incluso con 3-5 desajustes en el extremo distal del gRNA que reconoce el PAM (41). La escisión y unión defectuosa fuera del objetivo puede resultar en mutagénesis colateral, inducida por la reparación de la DSB por NHEJ, que es propensa a errores. Las consecuencias nocivas pueden surgir por mutaciones fuera del objetivo, como la activación de oncogenes o el silenciamiento de genes supresores de tumores (42).

Algunos aspectos de la HDR en la reparación de la DSB también pueden afectar la eficiencia de CRISPR. Para llevar a cabo una edición genética precisa con CRISPR y ser una alternativa terapéutica confiable, HDR debe ser el principal mecanismo de reparación después de la escisión mediada por Cas9. Debido a la baja tasa de recombinación de la HDR, que es sólo fácilmente disponible en células en división, este método debe volverse más robusto y flexible para ver su uso en la terapia de enfermedades, por ejemplo, con métodos que incentiven este tipo de reparación e inhiban la NHEJ (43).

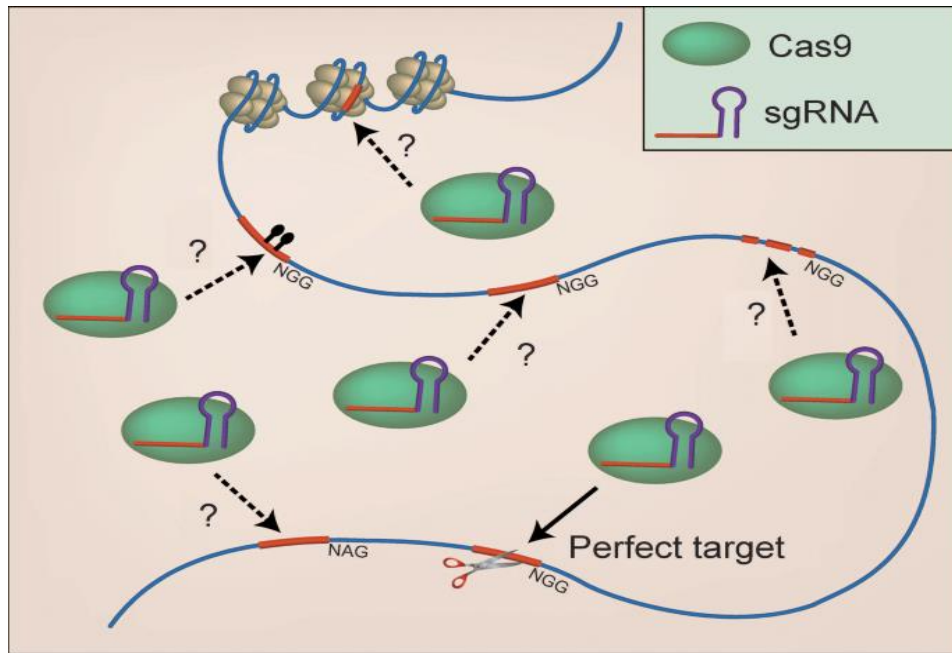


Figura 5. Efectos off-target

Figura 5. Representación de los posibles efectos *off-target* del sistema CRISPR/Cas (44).

Con las mejoras en el diseño del gRNA se ha reducido notablemente los efectos off-target; sin embargo, ahora mismo uno de los mayores retos que plantea este sistema son los efectos indeseados on-target, es decir, que el complejo Cas-gRNA llega correctamente al lugar que nosotros queremos, pero en su proceso de escisión no actúa como lo habíamos planeado, llegando a producir un extenso daño on-target, incluyendo grandes deleciones, inversiones e inserciones.

Un estudio Investigó la aparición de efectos nocivos on-target en células madre humanas después de la inserción de mutaciones relacionadas con la enfermedad mediante HDR y edición de genes mediante NHEJ. Identificaron grandes deleciones genómicas mono-alélicas y pérdida de heterocigosidad que escapan a los controles de calidad estándar en hasta el 40% de los clones editados. Para detectar de manera confiable tales eventos, describen herramientas basadas en genotipado simple, de bajo costo y ampliamente aplicable de PCR de genotipado cuantitativo (qgPCR) y polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y sugirieron su uso como controles de calidad adicionales después de la edición. Esto ayudaría a garantizar la integridad de los loci editados y aumentaría la confiabilidad de la edición CRISPR (79).

Inmunoterapia

La inmunoterapia es una forma de tratamiento del cáncer que utiliza las fortalezas del propio sistema inmunitario para prevenir, controlar y eliminar el cáncer.

La inmunoterapia puede:

- Educar al sistema inmunitario para reconocer y atacar células cancerosas específicas.
- Incrementar las células inmunitarias para ayudar a eliminar el cáncer.
- Proporcionar al cuerpo otros elementos que mejoren la respuesta inmunitaria.

La inmunoterapia se presenta de diversas formas: como anticuerpos dirigidos, vacunas contra el cáncer, transferencia de células adoptivas, virus que se inyectan en tumores, inhibidores de puntos de control, citocinas y adyuvantes. Algunos tratamientos de inmunoterapia utilizan ingeniería genética para mejorar la capacidad de las células inmunitarias para combatir el cáncer, lo que se conoce como terapia génica.

En los últimos años, se han desarrollado varias técnicas de manipulación genética que involucran mecanismos de reparación del DNA que incorporan modificaciones específicas en el genoma de una célula. Estas técnicas han hecho posible diversas alteraciones en el genoma de una manera específica, y así poder editar el genoma de las células tumorales para inducir la apoptosis, reducir la resistencia a los fármacos o restaurar los genes mutantes. También se pueden emplear en la manipulación genética del sistema inmunológico para potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales. CRISPR es una de estas técnicas. Debido a su excepcional potencial y eficacia, esta plataforma ha definido una nueva era, inclinando el equilibrio del tratamiento del cáncer a favor de la manipulación genética del tumor y las células inmunes. CRISPR se emplea preferentemente para tratar de determinar las funciones de varios genes y vías de señalización, lo que lleva al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Además, ha contribuido en avances como la identificación de la interacción entre el sistema inmunitario y el tumor, la investigación de células T con receptor de antígeno quimérico universal (CAR-T), la inhibición de los inhibidores de puntos de control inmunitarios y la viroterapia oncolítica (45).

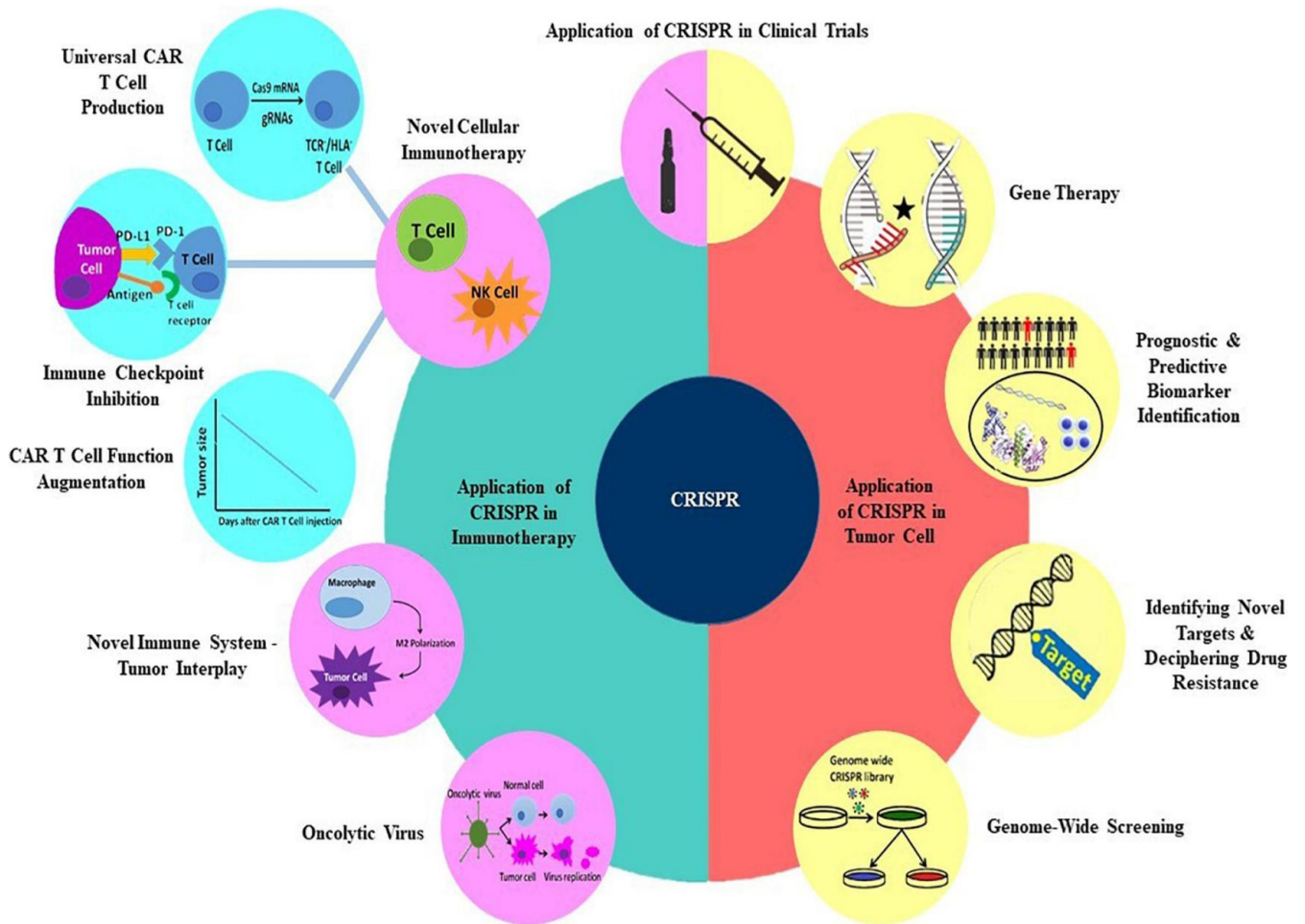


Figura 6. Aplicaciones de CRISPR en la inmunoterapia y sobre la célula tumoral

Figura 6. Aplicaciones de la tecnología CRISPR en múltiples aspectos del tratamiento del cáncer (45).

La figura 6 muestra la gran versatilidad y utilidad del sistema CRISPR/Cas tanto en el campo de la inmunoterapia como en otras muchas estrategias para luchar contra el cáncer. A la derecha de la imagen vemos su aplicación en la terapia génica sobre la propia célula tumoral, la identificación de biomarcadores pronóstico, así como el descubrimiento de nuevos objetivos a los que dirigir un tratamiento, o el descifrar la causa de que el tumor sea resistente a una terapia determinada. También nos permitiría realizar screenings masivos a la población. En la izquierda tenemos ejemplos de su aplicación para con la inmunoterapia: desarrollo de virus oncolíticos, capaces de infectar específicamente a las células tumorales y destruirlas; propiciar en los macrófagos que se diferencien hacia el fenotipo proinflamatorio para desencadenar una potente reacción inmune ante el tumor; mejora de la terapia con CAR-T; inhibición de los puntos de control del sistema inmune que limitan la acción de los linfocitos T; así como buscar el apoyo de otras células como los Natural Killer.

Nosotros vamos a centrarnos particularmente en dos: los CAR-T (Linfocito T con receptor de antígeno quimérico) y los TILs (Linfocitos infiltrantes de tumor).

CAR-T

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son receptores diseñados genéticamente que confieren una especificidad dirigida en una célula efectora inmunitaria (célula T) (46). El receptor de antígeno quimérico es una proteína de fusión modular que comprende: un dominio de unión a la diana extracelular que generalmente se deriva del fragmento variable de cadena única (scFv) del anticuerpo, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que contiene CD3z unido con ninguna, o bien una o dos moléculas coestimuladoras como CD28, CD137 y CD134. Las células T diseñadas para expresar CAR mediante tecnología de transferencia de genes son capaces de reconocer específicamente su antígeno diana a través del dominio de unión scFv, lo que da como resultado la activación de las células T de una manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y de este modo atacar específicamente a las células cancerígenas (47).

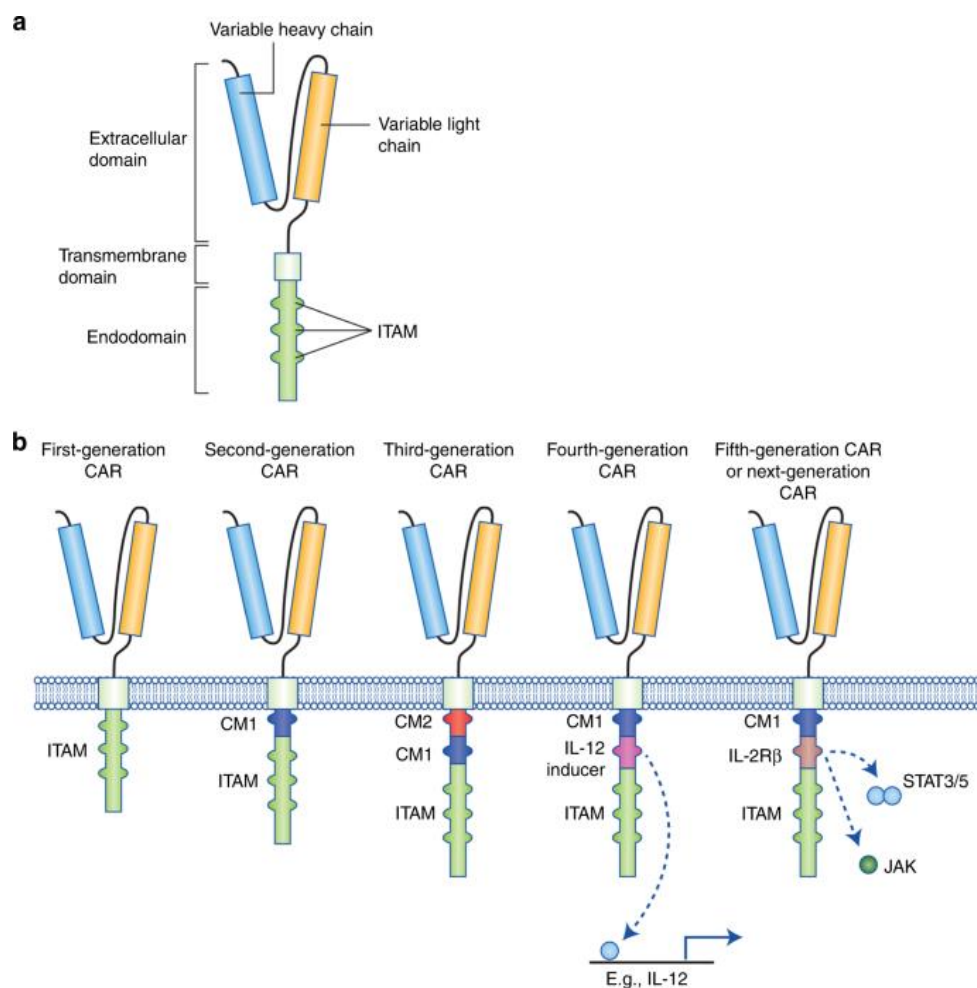


Figura 7. Estructura y evolución de los CAR

Figura 7. Estructura y evolución de los receptores de antígeno quimérico. El apartado a) representa la estructura central de un CAR, destacando los componentes principales del dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular (endodominio). El apartado b) muestra la evolución del desarrollo de CAR. La primera generación contenía solo motivos ITAM en el dominio intracelular. Los CAR de segunda generación incluían una molécula coestimuladora (CM) 1, y los CAR de tercera generación contenían un segundo CM. La cuarta generación de CAR se basó en CAR de segunda generación (que contienen 1 a 3 ITAM) emparejados con una quimiocina expresada de manera constitutiva o inducible (por ejemplo, IL-12). Estas células T también se denominan células T redirigidas para la destrucción universal mediada por citocinas (TRUCK). La quinta, o "próxima generación", también se basa en la segunda generación de CAR, con la adición de dominios intracelulares de receptores de citocinas (p. Ej., Fragmento de cadena IL-2R β) (48).

CAR-T aprobados

La terapia con CAR-T es un nuevo tratamiento eficaz para las neoplasias hematológicas. Cuatro productos de células T con CAR dirigidos contra células que expresan CD-19, y uno dirigido contra el BCMA (*B cell maturation antigen*), están aprobados para su uso clínico por la FDA de EE. UU y también por la EMA en Europa:

Dirigidos contra CD-19:

- Tisagenlecleucel (Kymriah), para leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños y adultos jóvenes de hasta 25 años cuyo cáncer no respondió al tratamiento anterior, ha vuelto dos o más veces o ha vuelto después de un trasplante de células madre, y subtipos de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) en adultos cuyo cáncer ha regresado o no respondió después de dos o más tratamientos previos (49).
- Axicabtagene ciloleucel (Yescarta), para LDCBG y linfoma mediastínico primario de células B grandes (LPMBD) en adultos cuyo cáncer ha regresado o ha dejado de responder al tratamiento anterior (50).
- Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi), para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células B grandes en recaída o refractario (R / R), incluido el LDCBG no especificado de otra manera (incluido el LDCBG derivado de un linfoma indolente), linfoma de células B de alto grado, LPMBD y linfoma folicular grado 3B (51).
- Brexucabtagene autoleucel (Tecartus), para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células del manto (LCM) en recaída o refractario (52).

Dirigido contra BCMA:

- Idecabtagene vicleucel (Abecma), para el tratamiento de pacientes adultos con mieloma múltiple en recaída o refractario después de cuatro o más líneas de terapia previas que incluyen un agente inmunomodulador, un inhibidor del proteasoma y un anticuerpo monoclonal anti-CD38 (53).

Aparte de su empleo en neoplasias hematológicas donde están demostrando un notable éxito, se intenta también extender su uso a los tumores sólidos, en los cuales ese éxito se ha visto limitado. Los desafíos que plantean los tumores sólidos a la terapia con células CAR-T se pueden describir en tres pasos: encontrar, ingresar y sobrevivir en el tumor. El uso de diseños de CAR duales que reconocen múltiples antígenos a la vez y la administración local de células CAR-T son estrategias que se han utilizado para superar el obstáculo de localizar el tumor. Además, el microambiente inmunosupresor del tumor (TME) tiene implicaciones para la función de las células T en términos de diferenciación y agotamiento, y la combinación de los CAR con el bloqueadores del punto de control o el agotamiento de otros factores supresores en el microambiente ha mostrado resultados muy prometedores para mitigar el fenómeno del agotamiento de las células T. Finalmente, identificar y superar los mecanismos asociados con la disfunción en las células CAR-T es de vital importancia para generar linfocitos que puedan proliferar y eliminar con éxito las células tumorales. La estructura y los dominios coestimuladores elegidos para el CAR pueden desempeñar un papel importante en la función general de las células CAR-T en el TME, y los CAR "blindados" que secretan citoquinas así como los CAR de tercera y cuarta generación con múltiples dominios coestimuladores ofrecen formas de mejorar la función de las células CAR-T (54).

La tecnología de edición genómica CRISPR/Cas ofrece posibles dianas y aplicaciones prometedoras para crear células CAR-T de una nueva generación, incluyendo células CAR-T universales al eliminar el TCR o HLA endógeno, células CAR-T más potentes mediante la ablación de moduladores inhibidores y células CAR-T más controlables añadiendo interruptores seguros o genes suicidas inducibles (55).

Efectos adversos

A pesar de sus prometedores resultados, las terapias con CAR-T no están exentas de riesgos para la salud de los pacientes, y es que al igual que la clásica quimioterapia, esta estrategia también presenta diversos efectos secundarios, que pueden ir desde unos síntomas considerados como leves, hasta graves desenlaces, incluyendo la muerte del paciente en casos extremos.

El Síndrome de liberación de citocinas (CRS) es uno de los efectos secundarios más prevalentes de esta terapia. A medida que las células CAR-T se multiplican, pueden liberar grandes cantidades de citoquinas en la sangre, entre las que destacan IFN- γ , TNF- α , IL-10 y particularmente IL-6, que pueden activar el sistema inmunológico y producir un indeseable incremento de la permeabilidad vascular. Los efectos secundarios graves de esta excesiva liberación pueden incluir: fiebre alta y escalofríos, dificultad para respirar, náuseas intensas, vómitos y / o diarrea, sensación de mareo o aturdimiento, dolores de cabeza, ritmo cardíaco acelerado, sensación de mucho cansancio, dolor muscular y / o articular, disfunción cardíaca, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y coagulación intravascular diseminada. La excesiva permeabilidad vascular puede producir anasarcas, edema pulmonar, derrame pericárdico y potencialmente fallo multiorgánico. El CRS requiere un diagnóstico precoz para poder instaurar el tratamiento adecuado: corticosteroides, y en caso de que fuera necesario, tocilizumab (anticuerpo monoclonal contra la interleuquina 6) (56).

Toxicidad neurológica: se desconoce la fisiopatología causante de estos efectos secundarios neurológicos, pero es posible que los niveles elevados de citoquinas sean en parte responsables

de las secuelas neurológicas. Se piensa que la permeabilidad vascular producida por el CRS podría alterar la barrera hematoencefálica, volviéndola más vulnerable. Podemos encontrarnos con: cambios en la conciencia, confusión o agitación, convulsiones, temblores o espasmos, dificultad para hablar y comprender, pérdida del equilibrio. Tratamiento: si es necesario, tratamiento de soporte y / o corticoides. Otros posibles efectos secundarios graves de la terapia con CAR-T pueden ser: Reacciones alérgicas durante la perfusión, niveles anormales de minerales en la sangre, como niveles bajos de potasio, sodio o fósforo; un sistema inmunológico debilitado, con mayor riesgo de infecciones graves, recuento bajo de células sanguíneas, que puede aumentar el riesgo de infecciones, fatiga y hematomas o sangrado. Entre los efectos adversos más graves también está descrito el síndrome de lisis tumoral tras la infusión de CAR-Ts (57).

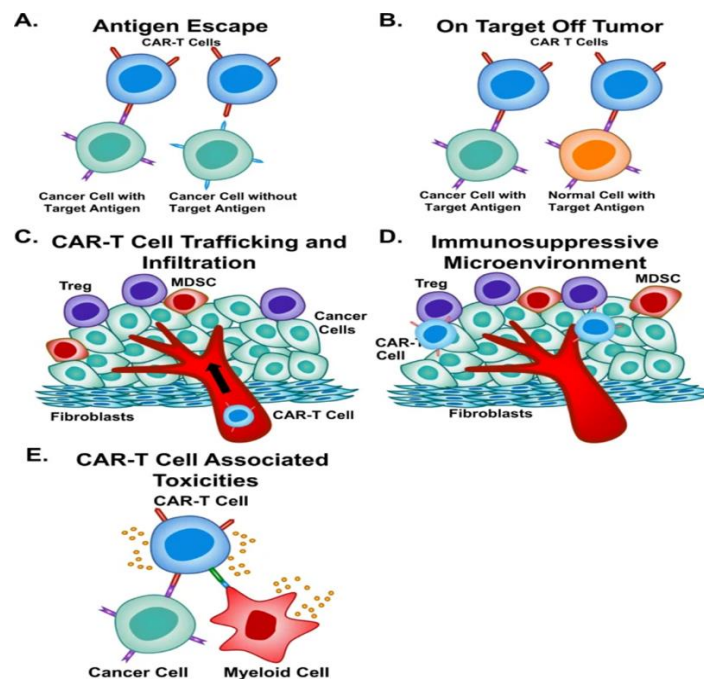


Figura 8. Limitaciones de la terapia CAR-T

Figura 8. Limitaciones de la terapia con células CAR-T. A) No reconocimiento de las células tumorales al no presentar el antígeno en la superficie. B) Reaccionan y atacan a células sanas con el marcador para el que están diseñados. C) Dificultad para llegar hasta donde se encuentra el tumor. D) El microambiente inmunosupresivo generado por el tumor limita la acción de los linfocitos. E) La toxicidad asociada a las CAR-T. Imagen tomada de (58).

El papel de la edición CRISPR en la mejora de las terapias CAR-T

Como vemos, no son pocas las limitaciones y los efectos indeseados que presenta esta terapia. Por ello, los científicos están buscando soluciones para tratar de optimizarla. Y es aquí donde la herramienta de edición genética CRISPR puede, y ya lo está haciendo, desarrollar un papel muy importante a la hora de mejorar la inmunoterapia. CRISPR-Cas9 logra una alta eficiencia, logrando buenos resultados en la edición múltiple (multiplex editing), y ofrece la posibilidad de

dirigir la integración del material genético introducido mediante recombinación homóloga. Permite resolver los problemas que se presentaron con las otras herramientas de edición genética (TALENs y ZFNs) y facilita enormemente problemas como el de la universalidad o la mejora de la supervivencia en los entornos tumorales (55).

Las estrategias para desarrollar nuevos y mejores CAR-Ts se basan en múltiples ediciones genéticas que permitan su universalidad, así como la introducción de mecanismos de control y reducción de efectos adversos, y mejorar su eficacia aumentando la supervivencia y evitando mecanismos de anergia tumoral. Veremos algunos estudios que se han llevado a cabo o se están desarrollando en este campo.

Dirigir un CAR al locus TRAC con CRISPR / Cas9 mejora la respuesta antitumoral (59). En este estudio, muestran que dirigir un CAR específico de CD19 al locus de la constante α del receptor de células T (TRAC) no solo da como resultado una expresión de CAR uniforme en las células T en sangre periférica humana, sino que también mejora la potencia de las células T editadas superando a las células CAR T generadas convencionalmente en un modelo de ratón de leucemia linfoblástica aguda. Además, demuestran que dirigir el CAR al locus TRAC evita la señalización continuada del CAR y establece la internalización y reexpresión efectivas del CAR después de una exposición única o repetida al antígeno, lo que retrasa la diferenciación y el agotamiento de las células T efectoras (59).

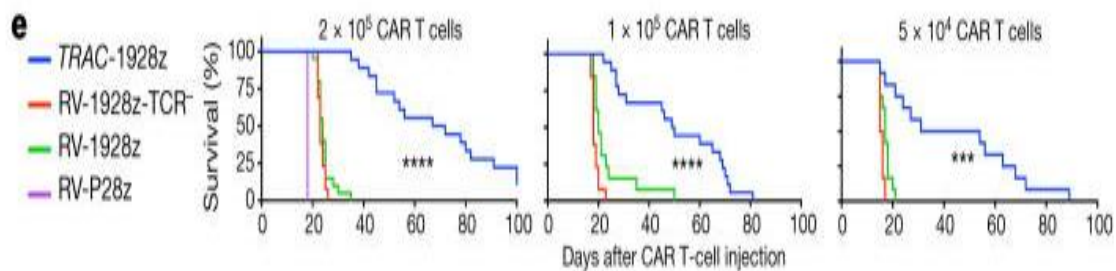


Figura 9. Análisis de la supervivencia con la inserción del CAR en el locus TRAC

Figura 9. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia de los ratones después de la inyección de los CAR-T. Vemos una mayor supervivencia en aquellos ratones con en el CAR en el locus TRAC. Imagen adaptada de (59).

En otro estudio usaron la edición múltiple del genoma para generar células CAR-T universales resistentes a la inhibición de PD1 (60). El propósito de los investigadores era demostrar que el uso de células T alogénicas con alteraciones genéticas como células efectoras universales proporciona una alternativa y potencial mejora a la terapia actual con CAR-Ts contra cánceres y enfermedades infecciosas. Diseño experimental: emplearon el sistema CRISPR/Cas9 para realizar una edición genética múltiple. Combinando la entrega lentiviral de CAR y la electrotransferencia de mRNA de Cas9 y gRNAs que se dirigen al TCR endógeno, microglobulina β -2 (B2M) y PD1 simultáneamente, para generar células T con CAR alogénicas con alteraciones genéticas deficientes en TCR, molécula HLA de clase I y PD1. Resultados: Las células CAR-T editadas con CRISPR mostraron potentes actividades antitumorales, tanto in vitro como en modelos animales y eran tan potentes como las células CAR-T no editadas. Además, las células

T de doble deficiencia de TCR y HLA de clase I tenían una alorreactividad reducida y no causaban enfermedad de injerto contra huésped. Finalmente, la edición triple simultánea del genoma mediante la adición de la alteración de PD1 condujo a una actividad antitumoral in vivo mejorada de las células CAR-T editadas genéticamente. Conclusiones: Las células CAR-T y TCR alogénicas con modificaciones genéticas podrían actuar como donantes universales y proporcionar una alternativa a las células T autólogas, las cuales conllevan ciertas dificultades y altos costes de producción. Los linfocitos CAR-T y TCR alterados genéticamente junto a la inhabilitación de puntos de control pueden ser potentes células efectoras contra cánceres y enfermedades infecciosas (60).

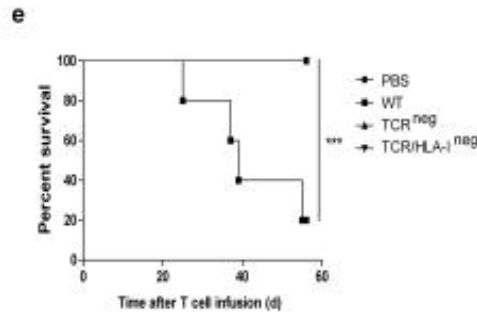


Figura 10. Análisis de supervivencia con CAR TCR/HLA-1 negativo

Figura 10. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia de los ratones después de la inyección de los CAR-T. Figura adaptada de (60).

De nuevo otros investigadores siguieron esta línea de actuación, y generaron CAR-T universales frente EGFRvIII produciendo el knockout de PD1 con CRISPR/Cas9, lo que llevó a una mejora de su acción en un modelo preclínico de un tumor sólido, el glioblastoma (61).

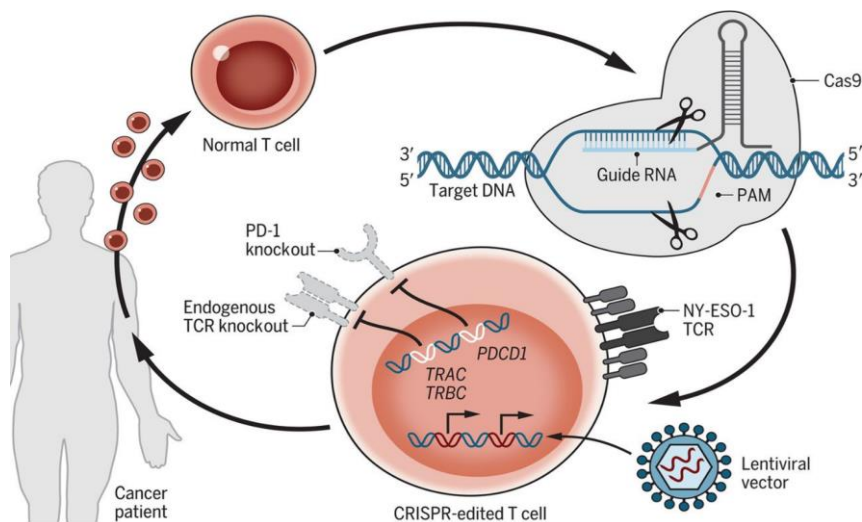


Figura 11. K.O. de TRAC y PD1

Figura 11. Edición del CAR-T con CRISPR/Cas9 para generar los KO de TRAC y PD1. Imagen tomada de (62).

Un mecanismo por el cual los gliomas y otros cánceres pueden obstaculizar las células CAR-T es a través de la expresión superficial de ligandos inhibidores como el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1). Utilizando el sistema CRISPR-Cas9, crearon células CAR-T universales resistentes a la inhibición de PD-1 a través de la edición genética múltiple, produciendo el KO del receptor de células T endógeno (TRAC), microglobulina beta-2 (B2M) y PD-1 (PDCD1). Las células CAR-T con triple edición demostraron una mejor actividad en modelos de glioma preclínicos. Se logró una supervivencia prolongada en ratones con tumores intracraneales después de la administración intracerebral, pero no intravenosa.

La edición de genes con CRISPR-Cas9 no solo proporciona una potencial fuente de células donantes universales alogénicas, sino que también permite la interrupción simultánea de la señalización del punto de control que, de otro modo, impide la funcionalidad antitumoral máxima (61).

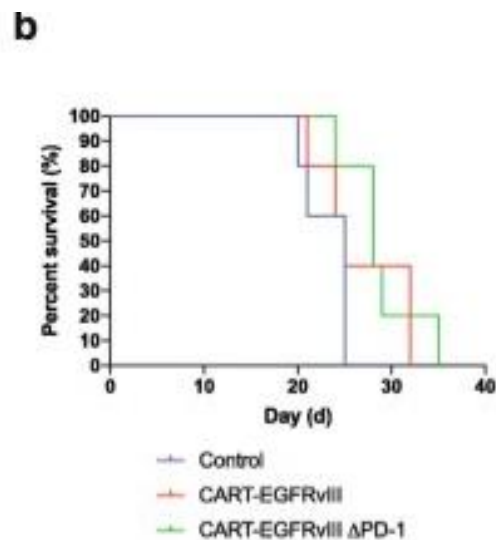


Figura 12. Análisis de supervivencia con CAR-T EGFRvIII delta PD1

Figura 12. Respuestas antitumorales producidas por CAR-T-EGFRvIIIΔPD-1 in vivo. Las curvas de supervivencia se estimaron para cada grupo utilizando la estimación de límite de producto de Kaplan-Meier (61).

Otros investigadores estudiaron el papel del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) como agente implicado en la toxicidad causada por los CAR-T y la inhibición de la terapia. Mostraron que la neutralización de GM-CSF con lenzilumab (anticuerpo monoclonal frente al GM-CSF) no inhibe la función de las células CART19 in vitro o in vivo. Además, la proliferación de células CART19 mejoró y el control duradero de la enfermedad leucémica se mantuvo mejor en xenoinjertos derivados de pacientes después de la neutralización de GM-CSF con lenzilumab. En un modelo de CRS y neuroinflamación de un xenoinjerto de leucemia linfoblástica aguda de un paciente, la neutralización de GM-CSF resultó en una reducción de la infiltración de células T y células mieloides en el sistema nervioso central, y una reducción significativa en la producción de neuroinflamación y en la prevención de CRS. Además, en este estudio generaron células CART19 deficientes en GM-CSF a través de la disrupción CRISPR/Cas9 del GM-CSF durante la fabricación de los CAR-T. Estas células GM-CSF KO CAR-T mantuvieron sus funciones normales y además tenían una actividad antitumoral mejorada in vivo, así como una supervivencia global mejorada, en comparación con las células CART19 wild type (63).

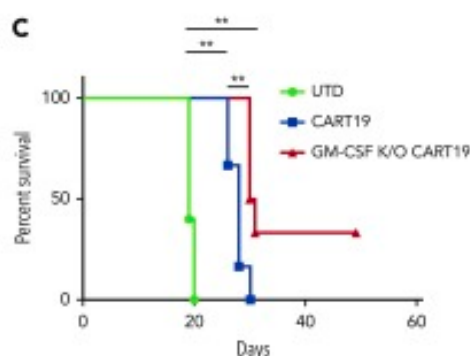


Figura 13. Análisis de supervivencia con CAR-T CD19 K.O. GM-CSF

Figura 13. Las células GM-CSF KO CART19 in vivo mejoran la supervivencia global en comparación con las células CART19 de tipo salvaje (wild type) en un modelo de xenoinjerto de recaída de alta carga tumoral de leucemia linfocítica aguda (ALL) utilizando una línea celular NALM6; 5 o 6 ratones por grupo. Imagen adaptada de (63).

Otras estrategias que se están investigando para evitar los efectos adversos se basan en incorporar un sistema inducible para detener a los CAR-T en caso de que causen una grave toxicidad. Por ejemplo, hay tres ensayos clínicos en curso (NCT02107963, NCT01822652 y NCT02439788) que incorporan una iC9 (caspasa-9 inducible) en productos de células T con CAR para proporcionar un método que permita eliminar las células T en caso de una posible toxicidad fuera del objetivo (55). Otra estrategia en la misma línea es el diseño de CAR-T para que expresen

en su membrana el CD20 y poder controlar la población de CARs en caso de que produzcan efectos adversos utilizando rituximab (anticuerpo monoclonal contra el CD20) (64).

En la siguiente tabla se resumen algunas de las estrategias llevadas a cabo en los últimos años con CRISPR/Cas9 para mejorar la terapia con CAR-Ts:

Tabla 1 Estrategias con CRISPR para mejorar la terapia CAR-T

Vía molecular	Modificación	Objetivo	Referencia
CTLA-4	K.O.	Evitar la vía de inhibición de CD28; CTLA4-B7	(65)
PD1	K.O.	Evitar la vía inhibitoria PD1-PDL1	(65)
GM-CSF	K.O.	Reducir la producción de ILs y CRS	(66)
CD7	K.O.	Evitar el fratricidio en CAR-CD7	(67)
FAS	K.O.	Evitar la toxicidad Fas-FasL sobre los CAR-T	(65)
CMH-I	K.O. de b2microglobulina	Evitar rechazo de las CAR-T vía CMH-I	(65)
TCR	K.O. de TRAC	Evitar GVHD suprimiendo el TCR de las CAR-T	(65)
TCR	K.I. de CAR	Expresión del CAR en el locus de TCR (mejora actividad)	(59)

La siguiente tabla corresponde a ensayos clínicos que se están desarrollando con CRISPR/Cas9 para la obtención de CAR-T universales:

Tabla 2 Ensayos clínicos con CRISPR para la obtención de CAR-T universales

Objetivo del CAR	Locus del K.O.	Enfermedad	NCT ID
CD19	TRAC y HLA-I	LLA y LNH	NCT03229876
CD19	TRAC y B2M	Leucemias y linfomas de linfocitos B	NCT03166878
CD19	TCR y CD52	RR LDCBG	NCT04026100
BCMA	TRAC y HLA-I	Mieloma múltiple	NCT03752541

LLA: Leucemia Linfoide Aguda; LNH: Linfoma No Hodgkin; RR LDCBG: Recaída o Refractario Linfoma Difuso de Células Grandes B.

Linfocitos Infiltrantes de Tumor

Las terapias TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*) se aprovechan de la inestabilidad genómica subyacente de las células cancerosas, lo que provoca la acumulación de mutaciones genéticas que dan lugar a antígenos cuya expresión se limita a los tumores (neoantígenos). Tras el reconocimiento de estos neoantígenos, los linfocitos T citotóxicos (LTC) se activan, provocando una respuesta inmune antitumoral. Se han encontrado LTC específicos de tumor en la sangre y el tejido tumoral de pacientes con cáncer. Estos últimos, conocidos como TILs, participan en la muerte de las células tumorales al reconocer su ligando afín (68). La principal diferencia con los CAR-T es que los TILs se han generado de forma natural contra el tumor, ya están diseñados para reconocer y atacar las células tumorales, sin tener que editarlos en el laboratorio.

Existe una heterogeneidad significativa entre los tipos de cáncer con respecto a la densidad de TIL, y los tumores se clasifican en general como inmunológicamente "calientes" o "fríos" según esta métrica. Aunque un alto grado de infiltración linfocítica se asocia con un buen pronóstico, en varios tipos de cáncer los tumores han desarrollado numerosos mecanismos para suprimir la respuesta inmunitaria (69).

El objetivo de la inmunoterapia es amplificar o restablecer la respuesta inmune antitumoral de un paciente. Debido a su papel central en la destrucción de las células tumorales, las células T

han sido el foco del diseño inmunoterapéutico. Sin embargo, todavía no contamos con ninguna terapia con TILs aprobada por la FDA o la EMA, aunque es cuestión de tiempo.

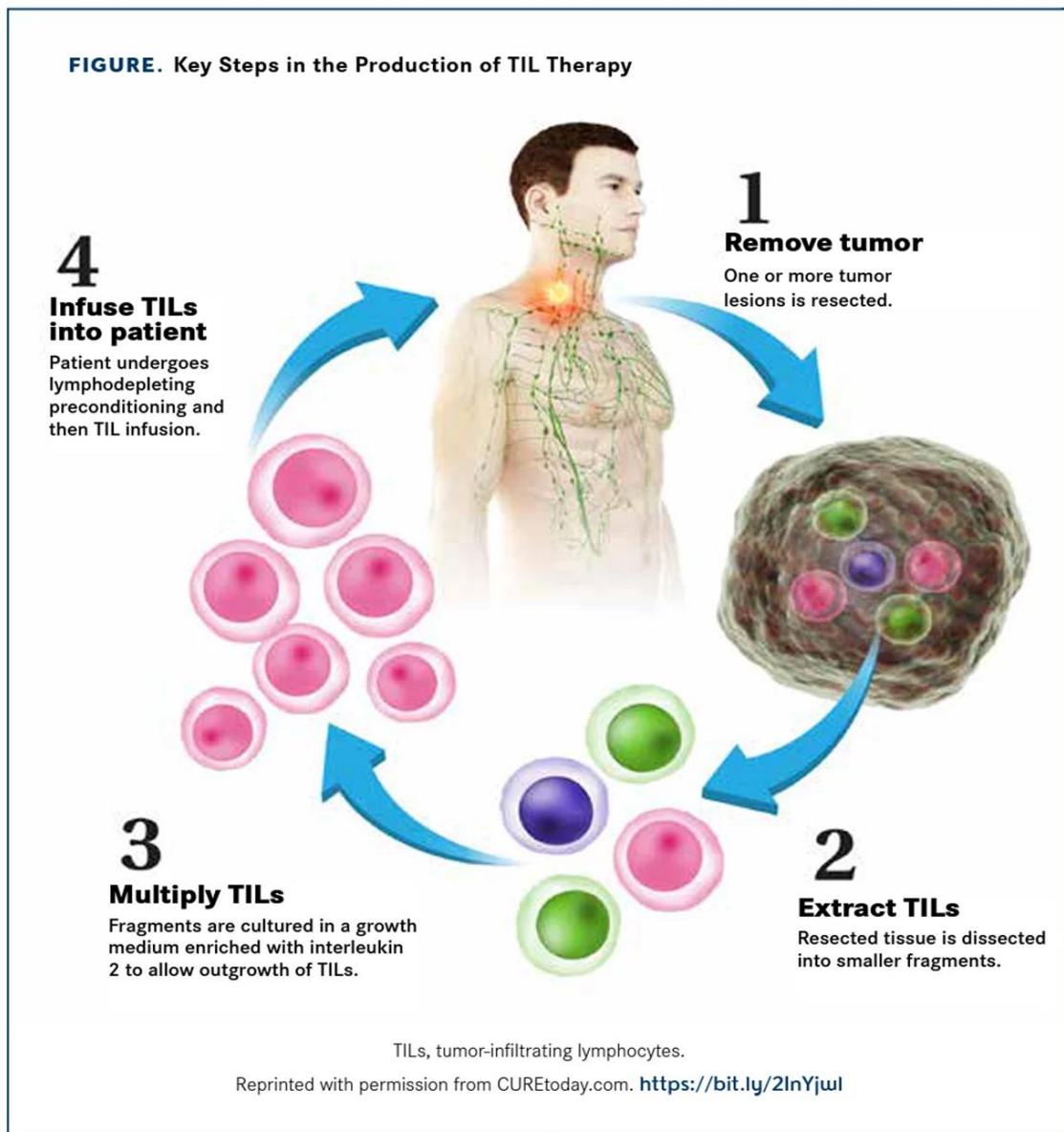


Figura 14. Pasos en la terapia con linfocitos infiltrantes de tumor

Figura 14. Pasos clave en la producción de la terapia con TILs. Primer paso: Obtención de tejido tumoral. Segundo paso: Extracción de los linfocitos que infiltran la pieza tumoral. Tercer paso: Amplificar la población de linfocitos cultivándolos. Cuarto paso: Infusión de los TILs en el paciente, con previa depleción linfocitaria. Imagen tomada de (70).

Efectos adversos

Las toxicidades observadas son de 4 tipos:

- Infección asociada con la inmunosupresión preparativa del huésped con quimioterapia antes de la administración celular.
- Liberación aguda de citocinas por las células infundidas.
- Complicaciones autoinmunes por atacar "autoantígenos" también expresados por algunos tejidos normales.
- Toxicidades fuera del objetivo donde se atacan antígenos distintos de los previstos.

Las complicaciones de la inmunosupresión y la liberación de citocinas suelen ser de corta duración y, en la actualidad, la mejor forma de abordarlas es con cuidados de soporte. La autoinmunidad, ya sea "dentro del objetivo, fuera del tumor" o "fuera del objetivo", es el resultado de la selección de objetivos (antígenos) imperfectos. En algunos casos, esto se puede tolerar porque los beneficios superan los costos. En otros casos, se deben encontrar antígenos diana alternativos (71).

Otras desventajas de esta terapia son: la ineficacia en el caso de que el tumor cambie los antígenos que reconocen los linfocitos, debido a la inmunoedición; la extracción y el aislamiento de la pieza tumoral es un proceso tedioso; retraso de la aplicación de la terapia debido al largo proceso de expansión ex vivo; el microambiente inmunosupresivo que genera el tumor puede llevar al fracaso de la terapia; las células tumorales regulan negativamente las moléculas del CMH de clase I, por lo que pueden escapar al ataque de los linfocitos T (72).

El papel de la edición CRISPR en la mejora de la terapia con TILs

Al igual que en los CAR-T, se han investigado (y se siguen investigando) diversas formas de mejorar la terapia con TILs, y como no, la edición con CRISPR/Cas9 tiene un gran protagonismo en este aspecto. Veamos algunos ejemplos:

Revertir el estado disfuncional de las células T que surge en el cáncer y las infecciones virales crónicas es un foco de las intervenciones terapéuticas; sin embargo, las terapias actuales son eficaces solo en algunos pacientes y en algunos tipos de tumores. Para obtener una comprensión molecular más profunda del estado disfuncional de las células T, este equipo analizó la población y los perfiles de RNA unicelular de los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) CD8 + y usó herramientas de edición genética para identificar un módulo causante de la disfunción de las células T que se puede desacoplar de la activación de estas células, e inactivarlo. Este módulo de disfunción distintivo es posterior a las metalotioneínas intracelulares que regulan el metabolismo del zinc y se puede identificar en la resolución de una sola célula. Además, identificó a Gata-3, un factor de transcripción de dedos de zinc en el módulo disfuncional, como regulador de la disfunción, y usó la edición con CRISPR/Cas9 para mostrar que favorece un fenotipo disfuncional en los TIL CD8 +. Los resultados abren nuevas vías para dirigir la inactivación de genes responsables de generar estados disfuncionales en las células T, mientras dejan intactos los programas de activación (73).

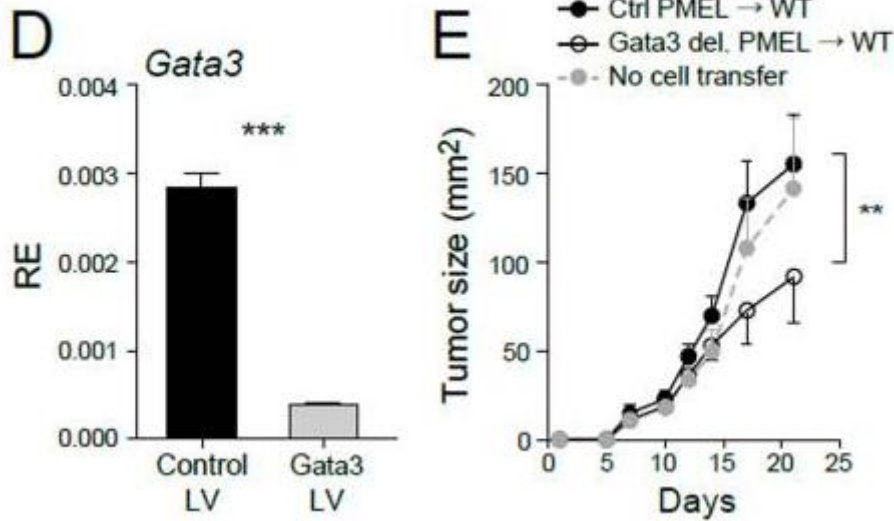


Figura 15. Eliminación dirigida de Gata3 y tamaño tumoral

Figura 15. **D**: Eliminación dirigida de Gata3 mediante la edición del genoma CRISPR/Cas9. Se seleccionaron células T CD8 + vírgenes de ratones transgénicos pmel, se infectaron con control o lentivirus Gata3 y se activaron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa en presencia de IL-2. Resultados de qPCR representativos que muestran el nivel de ARNm de Gata3 en el control frente a las células T CD8 + objetivo del lentivirus Gata3. **E**: Se transfirieron 1×10^6 células dirigidas a CRISPR / Cas9 a ratones WT (n = 5 / grupo) que portaban tumores de melanoma B16F10 (día 5 después del injerto del tumor). Se muestra el crecimiento medio del tumor. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante regresión lineal. ** valor de p <0,01. Imagen adaptada de (73).

Dentro de los tumores, como ya hemos mencionado anteriormente, las células T encuentran muchas señales inhibitoras en el microambiente tumoral, incluidos los ligandos para los receptores inhibitoras presentes en las células T. Hasta la fecha, se han identificado muchos receptores inhibitoras de células T, como la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), Activador de linfocitos 3 (LAG-3) y PD-1. Los tumores explotan estos receptores de puntos de control para amortiguar la función efectora de las células T como un medio de escape inmunológico. Para evitar esto, se han desarrollado anticuerpos contra estos receptores inhibitoras. Estas terapias con anticuerpos, principalmente dirigidas al eje PD-1 / PD-L1 o CTLA-4, previenen la activación de estos receptores. Como resultado, se restaura la función efectora de las células T y se pueden producir respuestas antitumorales (74). Este tipo de terapia se emplea, por ejemplo, en pacientes con melanoma, lo que resulta en una extraordinaria supervivencia a 3 años de aproximadamente el 50% de los pacientes. Además, también se están realizando ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la inmunoterapia combinada anti-PD-1 / PD-L1 y la terapia celular adoptiva con TIL (74). CRISPR/Cas9 también podría utilizarse para hacer que los TIL sean refractivos a señales inhibitoras al anular los receptores inhibitoras antes de la infusión. Con este enfoque, no se requiere la terapia con anticuerpos inmunomoduladores sistémicos, que se ha demostrado que presenta efectos secundarios significativos. Los efectos

adversos más comunes encontrados fueron colitis, hepatitis, insuficiencia de la hormona adrenocorticotrópica, hipotiroidismo, diabetes tipo 1, daño renal agudo y miocarditis (75).

Actualmente se está desarrollando un estudio sobre cánceres gastrointestinales metastásicos tratados con linfocitos infiltrantes de tumores en los que el gen que codifica el punto de control inmune intracelular CISH se inhibe mediante ingeniería genética CRISPR (NCT04426669).

Los linfocitos infiltrantes de tumores han demostrado su eficacia en ciertos cánceres, principalmente en el melanoma. La terapia combinada con inhibidores de puntos de control de la superficie celular también se ha empleado en un intento de mejorar la eficacia de estas terapias celulares. Ahora es posible la ingeniería genética de las células T para aumentar aún más la actividad antitumoral. CISH (proteína SH2 inducida por citoquinas) es un nuevo punto de control inmunológico intracelular y un importante regulador negativo de la función y señalización de las células T. La inhibición de CISH en linfocitos antitumorales de ratón da como resultado un marcado aumento en la capacidad de estos para mediar en la regresión tumoral después de la administración a ratones portadores de tumores. Además, los datos en células T humanas específicas de neoantígeno, genéticamente modificadas, en las que se inhibió CISH, mostraron una mayor avidez funcional de TCR y una mayor capacidad de estas células T para detectar mutaciones específicas del cáncer y generar respuestas inmunes sólidas contra sus antígenos cancerosos afines. Por tanto, estas células T parecen tener una ventaja significativa en la inducción de respuestas antitumorales en comparación con los linfocitos antitumorales de tipo salvaje. Los investigadores han desarrollado y optimizado una estrategia basada en CRISPR/Cas9 para la ingeniería genética precisa y eficiente en células T humanas primarias sin sacrificar su viabilidad o su función, lo que permite la inhibición de un punto de control intracelular hasta ahora no farmacológico. Por lo tanto, en este protocolo, los investigadores proponen inhibir el gen que codifica el punto de control intracelular objetivo CISH en linfocitos de pacientes con cánceres metastásicos que se seleccionan por actividad antitumoral con el fin de evaluar la seguridad y eficacia de la terapia con células T genéticamente modificadas para tumores sólidos en el contexto de una nueva inhibición de puntos de control.




Condition or disease 	Intervention/treatment 	Phase 
Gastrointestinal Epithelial Cancer	Drug: Cyclophosphamide	Phase 1
Gastrointestinal Neoplasms	Drug: Fludarabine	Phase 2
Cancer of Gastrointestinal Tract	Biological: Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL)	
Cancer, Gastrointestinal	Drug: Aldesleukin	
Gastrointestinal Cancer		
Colo-rectal Cancer		
Pancreatic Cancer		
Gall Bladder Cancer		
Colon Cancer		
Esophageal Cancer		
Stomach Cancer		

Figura 16. Enfermedades, intervenciones y fases del ensayo clínico con TILs

Figura 16. Primera columna: cánceres del tracto gastrointestinal. Segunda columna: fármacos empleados para la linfodepleción preinfusión de TILs (ciclofosfamida y fludarabina), los propios TIL y Aldesleukin (interleuquina 2) para estimular a los linfocitos T. Tercera columna: fases del estudio. Imagen adaptada de NCT04426669.

Nuevas estrategias en la terapia celular

Hemos mencionado ya el papel del microambiente inmunosupresor que generan los tumores como un factor muy negativo para la inmunoterapia. Se ha visto que formando parte de ese ambiente se encuentran los macrófagos asociados a tumor (TAMs), que puede promover la progresión del tumor (M2) o potenciar la inmunidad antitumoral (M1).

Se demostró que un subconjunto de TAM que expresan el receptor de folato β (FR β) poseen un perfil inmunosupresor de tipo M2. En modelos de ratón de tumor singénico, la eliminación de FR β + TAM en el TME mediada por CAR-T dirigidos contra el FR β da como resultado un enriquecimiento de monocitos proinflamatorios, afluencia de linfocitos T CD8 + endógenos específicos del tumor, retraso en la progresión del tumor, y supervivencia prolongada. El precondicionamiento del microambiente inmunosupresor tumoral con células CAR-T específicas de FR β también mejora la eficacia de las células CAR-T anti-mesotelina dirigidas al tumor, mientras que simultáneamente la coadministración de ambos productos CAR no lo hace. Estos resultados destacan el papel potenciador de los FR β + TAMs en el microambiente tumoral y las implicaciones terapéuticas de los agentes reductores de TAMs como complementos preparativos de las inmunoterapias convencionales que se dirigen directamente a los antígenos tumorales (76).

Hasta ahora la inmunoterapia celular se había centrado en los linfocitos T. Pero nuevas estrategias basadas en otros tipos celulares se están desarrollando. Una muy prometedora se basa en aprovechar los macrófagos que se encuentran en el tumor, en potenciar el fenotipo proinflamatorio M1, para luchar contra el cáncer.

Dadas las características funciones de los macrófagos y su capacidad para penetrar tumores, un equipo de investigadores diseñó, genéticamente, macrófagos humanos con CAR para dirigir su actividad fagocítica contra los tumores. Descubrieron un vector adenoviral quimérico capaz de superar la inherente resistencia de los macrófagos humanos primarios a la manipulación genética, e impulsó un fenotipo proinflamatorio sostenido (M1). Estos macrófagos con CAR (CAR-Ms) demostraron fagocitosis específica de antígeno y aclaramiento de tumores in vitro. En dos modelos de ratón de xenoinjerto de tumor sólido, una sola infusión de CAR-Ms humanos disminuyó la carga tumoral y prolongó la supervivencia promedio. La caracterización de la actividad CAR-M mostró que los CAR-M expresaban citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, favorecían la conversión de los macrófagos M2 transeúntes en M1, la regulación al alza de la maquinaria de presentación de antígeno, un reclutamiento y presentación de antígenos a las células T, además de resistir los efectos de citoquinas inmunosupresoras. En modelos de ratones humanizados, demostraron además que los CAR-Ms inducen un efecto proinflamatorio en el microambiente tumoral y potencian la actividad de las células T antitumorales (77).

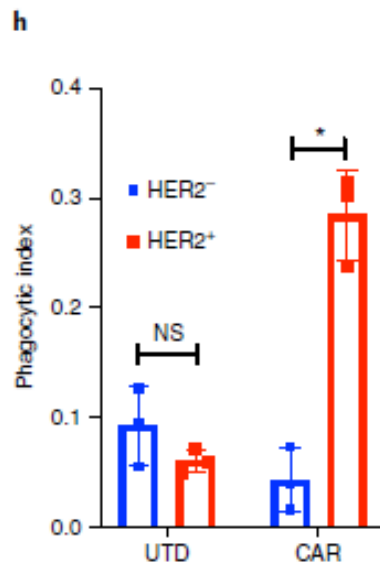


Figura 17. Índice de fagocitosis

Figura 17. Fagocitosis basada en perlas marcadas con Rodo con pH de control o funcionalizadas con HER-2 por UTD (Untransduced, macrófagos no transducidos) y CAR-Ms contra HER-2. Imagen adaptada de (77).

La investigación con los Natural Killers con receptor de antígeno quimérico (CAR-NK) también está consiguiendo unos resultados prometedores. En comparación con las células CAR-T, las células CAR-NK podrían ofrecer algunas ventajas significativas, que incluyen: (1) una mayor seguridad, como un síndrome de liberación de citocinas y una neurotoxicidad ambos menores en entornos autólogos, y un descenso de la enfermedad de injerto contra huésped en entornos alogénicos; (2) múltiples mecanismos para activar la actividad citotóxica, y (3) alta viabilidad para la fabricación "off-the-shelf". Las células CAR-NK podrían diseñarse para dirigirse a diversos antígenos, mejorar la proliferación y la persistencia in vivo, aumentar la infiltración en tumores sólidos, superar el microambiente tumoral resistente y, en última instancia, lograr una respuesta antitumoral eficaz (80).

Reflexión personal desde el punto de vista clínico

La terapia celular con CAR-T (única aprobada por el momento para su uso en clínica) ha permitido remisiones en pacientes con cánceres hematológicos que ya estaban prácticamente desahuciados. Está llegando cada vez a más hospitales de primer nivel, y seguramente dentro de poco tiempo los CAR-T pasen a ser la primera línea de múltiples leucemias y linfomas debido a sus asombrosos resultados, según refutados hematólogos que están trabajando e investigando con estas células. He podido rotar por el servicio de hematología de un hospital universitario de primer nivel (H.U. Álvaro Cunqueiro, Vigo), y hablar de esta terapia con una hematóloga que sigue sus avances muy de cerca: según su experiencia, la técnica está dando muy buenos resultados, concretamente frente al linfoma difuso de células grandes B, donde están alcanzando remisiones espectaculares tras el fracaso de varias líneas previas de tratamiento. Contaba el caso de un paciente que padecía este linfoma que hemos mencionado en un estadio

muy avanzado, que fue sometido a un trasplante de médula ósea, tras el cual la enfermedad recidivó, y cuando ya se habían agotado las demás alternativas terapéuticas, decidieron incluirlo en un ensayo clínico con CAR-T, obteniendo una respuesta espectacular (ese paciente lleva ahora tres años en remisión completa). Ella está convencida de que pronto los CAR-T serán la segunda, o hasta puede que la primera, línea de tratamiento en muchos pacientes.

Un problema con el que se encuentran los pacientes al llegar a esta terapia después de pasar por diversas líneas de tratamiento muy agresivas y que desafortunadamente no logran la remisión de la enfermedad es la extenuación que desarrollan los linfocitos. Cuando por fin se opta por la terapia con CAR-T, las células inmunológicas están exhaustas, lo que perjudica notablemente el máximo potencial de este tratamiento. Sería de gran utilidad disponer de marcadores biológicos que nos permitiesen predecir la respuesta del paciente ante diferentes tratamientos, para así ofrecer de entrada la mejor terapia y no reservar los CAR-T para el final, cuando los linfocitos ya están resentidos debido a las terapias que no han funcionado.

Conclusión

La inmunoterapia celular se ha convertido en una importantísima terapia contra el cáncer, y en los próximos años estoy seguro de que asistiremos a una revolución en este campo. El sistema CRISPR/Cas se postula como una de las herramientas claves para liderar esta revolución. Esta herramienta es capaz de producir ediciones eficaces y rápidas a diferentes niveles del genoma, e incluso permite trabajar con más de un gen a la vez. Se ha empleado, por ejemplo, para conocer la función de un gen, generar modelos de experimentación, explorar rutas metabólicas, así como en el descubrimiento de potenciales marcadores biológicos. En cuanto a su papel en la mejora de la inmunoterapia, CRISPR/Cas está dando grandes resultados en multitud de novedosas estrategias para mejorar las terapias celulares: conseguir CAR-Ts universales, lo que permitiría la producción en masa de este producto que no sería rechazado por el sistema inmune del paciente al no detectarlo como extraño; crear linfocitos más activos y resistentes a la inmunosupresión que genera el tumor, mediante la edición de los receptores de citoquinas inhibitorias y potenciando los que responden a las citoquinas activadoras, así como eliminando los elementos implicados en los puntos de control inmunitario como PD1 o CTLA-4. La terapia con linfocitos infiltrantes de tumor no se queda atrás, sigue el ejemplo de los CAR-T, tratando de conseguir potenciar a las células T mediante la edición de las vías inhibitorias sin perder eficacia en la lucha contra las células tumorales. Y en este campo, hasta ahora protagonizado por los linfocitos T, se abren camino los macrófagos, con un gran potencial debido a su capacidad de fagocitar y presentar antígenos, ambas actividades con posibilidad de orientarse a la eliminación del tumor. La combinación de macrófagos con linfocitos (CAR-M y CAR-T, con TILs, o incluso con los CAR-NK) podría potenciar la inmunoterapia celular, o la incorporación de partículas microscópicas de productos quimioterápicos asociados a macrófagos, valiéndose de su capacidad para infiltrar el tejido tumoral y así llevar el fármaco directamente a donde está el cáncer. Ya se están realizando investigaciones al respecto, y en un futuro no muy lejano, gracias a las herramientas de edición genética, podrían convertirse en la primera línea de tratamiento frente a múltiples tumores, tanto hematológicos como sólidos.

Referencias

1. 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>
2. 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.
3. 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.
4. Figura 1: Gridina, M. (2019). Improvement of the knock-in efficiency in the genome of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR/Cas9 system. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 22. 1026-1032. 10.18699/VJ18.446.
5. Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu Rev Genet. 2010;44:113–39.
6. Ishino, Y et al. «Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product». Journal of Bacteriology. 1987; 169(12): 5429-5433.
7. Mojica, FJ, Juez, G, Rodríguez-Valera, F. «Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites». Molecular Microbiology. 1993; 9(3): 613-621.
8. Mojica, FJ et al. «Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea Haloferax mediterranei and Haloferax volcanii and could be involved in replicon partitioning». Molecular Microbiology. 1995; 17(1): 85-93.
9. Mojica FJ, et al. «Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria». Molecular Microbiology. 2000; 36(1): 244-246.
10. Jansen, R et al. «Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes». Molecular Microbiology. 2002; 43(6): 1565-1575.
11. Mojica FJ et al. «Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements». Journal of Molecular Evolution. 2005; 60(2): p. 174-182.
12. Pourcel, C, Salvignol, G, Vergnaud, G. «CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies». Microbiology. 2005; 151(Pt 3): 653-663.
13. Bolotin, A et al. «Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin». Microbiology. 2005; 151(Pt 8): 2551-2561.
14. Lander, ES. «The Heroes of CRISPR». Cell. 2016; 164(1-2): 18-28.

15. Jinek, M et al. «A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity». *Science*. 2012; 337(6096): 816-821.
16. Gómez-Tatay, L., & Aznar, J. (2019). *CRISPR-CAS9. EL MAYOR AVANCE EN TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÉTICA REQUIERE UNA REFLEXIÓN ÉTICA* (p. 15). Universidad Católica de Valencia. <http://aebioetica.org/revistas/2019/30/99/171.pdf>
17. Barrangou, R.; Marraffini, L.A. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol. Cell* 2014, 54, 234–244.
18. Yosef, I.; Goren, M.G.; Qimron, U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 5569–5576.
https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2015.0496?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&
19. Makarova, K.S.; Wolf, Y.I.; Alkhnbashi, O.S.; Costa, F.; Shah, S.A.; Saunders, S.J.; Barrangou, R.; Brouns, S.J.J.; Charpentier, E.; Haft, D.H.; et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015, 13, 722–736.
20. Guan, Lihong & Han, Yawei & Zhu, Shaoyi & Lin, Juntang. (2016). Application of CRISPR-Cas system in gene therapy: Pre-clinical progress in animal model. *DNA Repair*. 46. 10.1016/j.dna-rep.2016.07.004.
21. Makarova, K.S.; Grishin, N.V.; Shabalina, S.A.; Wolf, Y.I.; 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. *Biol. Direct*. 2006, 1, 1–26.
22. Yosef, I.; Goren, M.G.; Qimron, U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 5569–5576.
23. Nuñez, J.K.; Kranzusch, P.J.; Noeske, J.; Wright, A.V.; Davies, C.W.; Doudna, J.A. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014, 21, 528–534.
24. Mojica, F.J.M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 2009, 155, 733–740.
25. Anders, C.; Niewoehner, O.; Duerst, A.; Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 2014, 513, 569–573.
26. Shah, S.A.; Erdmann, S.; Mojica, F.J.M.; Garrett, R.A. Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biol.* 2013, 10, 891–899.
27. Marraffini, L.A.; Sontheimer, E.J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.* 2010, 11, 181–190.
28. Loureiro A, da Silva GJ. CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics*. 2019; 8(1):18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010018>
29. Deltcheva, E.; Chylinski, K.; Sharma, C.M.; Gonzales, K.; Chao, Y.; Pirzada, Z.A.; Eckert, M.R.; Vogel, J.; Charpentier, E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011, 471, 602–607.

30. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-.) 2012, 337, 816–821.
31. Bikard, D.; Jiang, W.; Samai, P.; Hochschild, A.; Zhang, F.; Marraffini, L.A. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, 7429–7437.
32. Lo, A.; Qi, L. Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR–Cas systems. *F1000Research* 2017, 6, 747.
33. Véron, N.; Qu, Z.; Kipen, P.A.S.; Hirst, C.E.; Marcelle, C. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev. Biol.* 2015, 407, 68–74.
34. Swiech, L.; Heidenreich, M.; Banerjee, A.; Habib, N.; Li, Y.; Trombetta, J.; Sur, M.; Zhang, F. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 102–106.
35. Shalem, O.; Sanjana, N.E.; Hartenian, E.; Shi, X.; Scott, D.A.; Heckl, D.; Ebert, B.L.; Root, D.E.; Doench, J.G. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* (80-.) 2014, 343, 84–87.
36. Wu, Z.; Yang, H.; Colosi, P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 2010, 18, 80–86.
37. Somia, N.; Verma, I.M. Gene therapy: Trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 2000, 1, 91–99.
38. Ramakrishna, S.; Kwaku Dad, A.B.; Beloor, J.; Gopalappa, R.; Lee, S.K.; Kim, H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 2014, 24, 1020–1027.
39. Mout, R.; Ray, M.; Yesilbag Tonga, G.; Lee, Y.W.; Tay, T.; Sasaki, K.; Rotello, V.M. Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano* 2017, 11, 2452–2458.
40. Finn, J.D.; Smith, A.R.; Patel, M.C.; Shaw, L.; Youniss, M.R.; van Heteren, J.; Dirstine, T.; Ciullo, C.; Lescarbeau, R.; Seitzer, J.; et al. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* 2018, 22, 2455–2468.
41. Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* (80-.) 2013, 339, 819–823.
42. Brunet, E.; Simsek, D.; Tomishima, M.; DeKolver, R.; Choi, V.M.; Gregory, P.; Urnov, F.; Weinstock, D.M.; Jasin, M. Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 10620–10625.
43. Heyer, W.-D.; Ehmsen, K.T.; Liu, J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 2010, 44, 113–139.
44. Wu, X., Kriz, A.J. & Sharp, P.A. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol* 2, 59–70 (2014). <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>
45. Azangou-Khyavy M, Ghasemi M, Khanali J, Boroomand-Saboor M, Jamalkhah M, Soleimani M, Kiani J. CRISPR/Cas: From Tumor Gene Editing to T Cell-Based Immunotherapy of Cancer.

- Front Immunol. 2020 Sep 29;11:2062. doi: 10.3389/fimmu.2020.02062. PMID: 33117331; PMCID: PMC7553049.
46. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res.* 2017 Jun 24;5:22. doi: 10.1186/s40364-017-0102-y. PMID: 28652918; PMCID: PMC5482931.
47. Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol.* 2017 Feb 21;10(1):53. doi: 10.1186/s13045-017-0423-1. PMID: 28222796; PMCID: PMC5320663.
48. Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S. et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* 120, 26–37 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0325-1>
49. U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>
50. U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/yescarta-axicabtagene-ciloleucel>
51. U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-maraleucel>
52. U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/tecartus-brexucabtagene-autoleucel>
53. U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/abecma-idcabtagene-vicleucel>
54. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019 Feb 5;10:128. doi: 10.3389/fimmu.2019.00128. PMID: 30804938; PMCID: PMC6370640.
55. 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/bfgp/elz042>
56. 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.
57. 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.
58. Sterner, R.C., Sterner, R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 11, 69 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>.
59. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, Odak A, Gönen M, Sadelain M. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017 Mar 2;543(7643):113–117. doi: 10.1038/nature21405. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28225754; PMCID: PMC5558614.
60. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2017 May 1;23(9):2255–2266. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27815355; PMCID: PMC5413401.
61. Choi BD, Yu X, Castano AP, Darr H, Henderson DB, Bouffard AA, Larson RC, Scarfò I, Bailey SR, Gerhard GM, Frigault MJ, Leick MB, Schmidts A, Sagert JG, Curry WT, Carter BS, Maus MV. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *J Immunother Cancer.* 2019 Nov 14;7(1):304. doi: 10.1186/s40425-019-0806-7. PMID: 31727131; PMCID: PMC6857271.

62. Stadtmauer, E. A., Fraietta, J. A., Davis, M. M., Cohen, A. D., Weber, K. L., Lancaster, E., Mangan, P. A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V. E., Xu, J., Jung, I. young, Joseph Melenhorst, J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., ... June, C. H. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 367(6481). <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
63. Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, Yang N, Khadka RH, Forsman CL, Hansen MJ, Jin F, Ayasoufi K, Hefazi M, Schick KJ, Walters DK, Ahmed O, Chappell D, Sahnoud T, Durrant C, Nevala WK, Patnaik MM, Pease LR, Hedin KE, Kay NE, Johnson AJ, Kenderian SS. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood*. 2019 Feb 14;133(7):697-709. doi: 10.1182/blood-2018-10-881722. Epub 2018 Nov 21. PMID: 30463995; PMCID: PMC6376281.
64. Philip, B. et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood*. 124, 1277–1287 (2014).
65. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):17002-17011. doi: 10.18632/oncotarget.15218. PMID: 28199983; PMCID: PMC5370017.
66. 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 22;(149). doi: 10.3791/59629. PMID: 31380838.
67. Cooper ML, Choi J, Staser K, Ritchey JK, Devenport JM, Eckardt K, et al. An “offthe-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*. 2018 Sep 1;32(9):1970–83.
68. Antohe M, Nedelcu RI, Nichita L, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: the regulator of melanoma evolution. *Oncol Lett*. 2019;17(5):4155-4161. doi:10.3892/ol.2019.9940.
69. Shembrey C, Huntington ND, Hollande F. Impact of tumor and immunological heterogeneity on the anti-Cancer immune response. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1217. doi:10.3390/cancers11091217.
70. Jane de Lartigue, TILs, the ultimate in personalized immunotherapy move closer to market *OncologyLive*, Vol. 21/No. 22, Volume 21, Issue 22 Pages: 61-64.
71. Yang JC. Toxicities associated with adoptive T-cell transfer for Cancer. *Cancer J*. 2015;21:506–9.
72. Papaioannou, Nikos & Beniata, Ourania & Vitsos, Panos & Tsitsilonis, Ourania & Samara, Pinelopi. (2016). Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of Translational Medicine*. 4. 10.21037/atm.2016.04.01.
73. Singer M, Wang C, Cong L, Marjanovic ND, Kowalczyk MS, Zhang H, Nyman J, Sakuishi K, Kurtulus S, Gennert D, Xia J, Kwon JYH, Nevin J, Herbst RH, Yanai I, Rozenblatt-Rosen O, Kuchroo VK, Regev A, Anderson AC. A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. *Cell*. 2016 Sep 8;166(6):1500-1511.e9. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.052. Erratum in: *Cell*. 2017 Nov 16;171(5):1221-1223. PMID: 27610572; PMCID: PMC5019125.
74. Rohaan M.W., Van Den Berg J.H., Kvistborg P., Haanen J.B.A.G. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *J. Immunother. Cancer*. 2018;6.
75. Bajwa R., Cheema A., Khan T., Amirpour A., Paul A., Chaughtai S., Patel S., Patel T., Bramson J., Gupta V., Levitt M., Asif A., Hossain M.A. Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors

(Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study. *J. Clin. Med. Res.* 2019;11:225–236. doi: 10.14740/jocmr3750.

76. Rodriguez-Garcia, A., Lynn, R.C., Poussin, M. et al. CAR-T cell-mediated depletion of immunosuppressive tumor-associated macrophages promotes endogenous antitumor immunity and augments adoptive immunotherapy. *Nat Commun* 12, 877 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20893-2>

77. Klichinsky, M., Ruella, M., Shestova, O. et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* 38, 947–953 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0462-y>

78. Lee, H., Kim, JS. Unexpected CRISPR on-target effects. *Nat Biotechnol* 36, 703–704 (2018). <https://doi.org/10.1038/nbt.4207>

79. Weisheit I, Kroeger JA, Malik R, Klimmt J, Crusius D, Dannert A, Dichgans M, Paquet D. Detection of Deleterious On-Target Effects after HDR-Mediated CRISPR Editing. *Cell Rep.* 2020 May 26;31(8):107689. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107689. PMID: 32460021.

80. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine.* 2020 Sep;59:102975. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102975. Epub 2020 Aug 24. PMID: 32853984; PMCID: PMC7452675.