

TRABAJO FIN DE GRADO

APLICACIÓN DE CRISPR EN LA EDICIÓN DE CÉLULAS T PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CÁNCER.

GRADO EN MEDICINA

Autora: Carmen Sempere Navarro

Tutora: Ana María Sánchez-Pérez

Universitat Jaume I, Castellón 2021.

ÍNDICE

Hoja de autorización de la tutora.....	2
Abreviaturas.....	3
Resumen/Abstract.....	4
“Extended summary”	5
Introducción	8
CRISPR-Cas9.....	8
Inmunoterapia.....	14
CRISPR e inmunoterapia.....	19
Objetivos.....	20
Justificación.....	20
Métodos.....	21
Criterios de elegibilidad.....	21
Fuentes de información.....	22
Estrategia de búsqueda.....	22
Selección de los estudios.....	23
Proceso de extracción de datos.....	23
Evaluación del riesgo de sesgo.....	23
Evaluación de la calidad metodológica.....	24
Resultados.....	25
Tabla de las principales características de los estudios.....	25
Resumen de los estudios.....	27
Tabla comparativa de los resultados de los estudios.....	38
Evaluación del riesgo de sesgo.....	38
Discusión	39
Conclusiones.....	40
Anexo.....	47
Material complementario: entrevista a Francis Mojica.....	55

TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG: APLICACIÓN DE CRISPR EN LA EDICIÓN DE CÉLULAS T PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CÁNCER

ALUMNO/A: Carmen Sempere Navarro

DNI: 48668116R

PROFESOR/A TUTOR/A: Ana M Sánchez-Pérez

Fdo (Tutor/a):



COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):

Fdo (CoTutor/a interno):

ABREVIATURAS

CART cells: “Chimeric Antigen Receptor T cells”.

CRISPR: “Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats”.

DSB: “Double-Strand Break”.

INE: Instituto Nacional de Estadística

LAL: Leucemia aguda linfoblástica

LLC: Leucemia linfocítica crónica

LDCBG: Linfoma Difuso de Células B Grandes.

NGS: “Next Generation Sequencing”.

PAM: “Protospacer Adjacent Motif”

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.

sgRNA: “single-guide RNA”.

TALEN: “Transcription activator-like effector nuclease”.

TCR: “T Cell Receptor”.

WGS: “Whole Genome Sequencing”.

ZNF: “Zinc-fingers nucleases”.

ABSTRACT:

CRISPR-Cas technology is a powerful molecular tool providing a simple and promising way of genome editing. Its application in immunotherapy field enables to optimize the function of human T cells to fight cancer. The primary aim of this systematic review was to check safety, feasibility and efficacy of CRISPR-Cas edited T cells therapy in patients with refractory cancer. Therefore, the first-in-human phase I clinical trials using this technology have been evaluated. Articles were extracted from Pubmed database, and the methodology employed follows Cochrane Handbook 5.1.0 guidelines. The adverse events reported in both studies were rare and reversible. On the other hand, editing efficiency was shown by the low frequency of “off-target” events, term used to designate the occurrence of unwanted mutations. Finally, *in vivo* persistence of edited T cells was stable in the long-term. Regarding antitumor efficacy, it should be noted that some patients achieved disease stability during a limited period of time, but none of them showed a significant tumor regression. We conclude that CRISPR-edited T cells technique is safe and feasible. Nevertheless, further studies would be needed to establish its efficacy.

Key words: CRISPR-Cas9, edited T cells, cancer, immunotherapy, gene therapy.

RESUMEN

La tecnología CRISPR-Cas es una potente herramienta molecular que permite editar el genoma de forma simple y específica. Su aplicación en el ámbito de la inmunoterapia ha permitido optimizar la función de las células T humanas para combatir el cáncer. Esta revisión sistemática planteó como principal objetivo comprobar la seguridad, viabilidad y eficacia de la terapia con células T genéticamente modificadas mediante CRISPR-Cas, en pacientes con cáncer refractario. Para ello, analizamos los dos primeros ensayos clínicos llevados a cabo con esta técnica, ambos en fase I. Los artículos fueron extraídos de la base de datos Pubmed y la metodología empleada sigue las pautas establecidas por el manual Cochrane 5.1.0. Los efectos adversos reportados en ambos estudios fueron escasos y reversibles. Por otro lado, la eficiencia de edición genética se demostró mediante una baja frecuencia de eventos “off-target”, término utilizado para designar la aparición de mutaciones no deseadas. Por último, la persistencia *in vivo* de las células T editadas, fue prolongada. En cuanto a la eficacia antitumoral, cabe señalar que se logró la estabilidad de la enfermedad en algunos pacientes durante un período limitado de tiempo, pero ninguno de ellos mostró una regresión tumoral significativa. Concluimos que la aplicación de células T editadas con CRISPR es segura y viable. Sin embargo, se necesitarán próximos estudios para determinar su eficacia.

Palabras clave: CRISPR-Cas9, células T editadas, cáncer, inmunoterapia, terapia génica.

EXTENDED SUMMARY

Introduction:

CRISPR-Cas is a promising technology capable of genome editing in a much more specific, fast, and economic way, compared to other tools such as TALEN or zinc-fingers-nucleases.

CRISPR is an adaptative immune system found in the genome of prokaryotic organisms. It is composed of repeated and palindromic sequences separated by regularly arranged spacers, hence its name “Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats”. Moreover, adjacent to these CRISPR loci, there are nucleases known as Cas proteins. Based on this natural mechanism, it has been possible to develop a synthetic genome editing tool. The most widely used system in genome editing has been type II, CRISPR-Cas9.

CRISPR-Cas9 mechanism consists of three phases. When a virus or plasmid infects a prokaryotic cell and injects its genetic material for replication, the first phase begins. In this phase, the Cas1 and Cas2 proteins integrate the foreign genetic material into the spacers of the CRISPR region. In the second phase, this acquired spacer, as well as the adjacent repeat segment are transcribed to form an RNA molecule, known as CRISPR-RNA or crRNA. Finally, if the same pathogen re-infects the host, Cas9 protein and crRNA will form a complex together with a third element known as transactivating RNA or tracrRNA; the latter being necessary for the complex activation. In this way, the formed complex will be directed towards the invader genetic material, specifically to the complementary region of the crRNA. Once recognized, Cas9 will generate a double-strand-break cut, thus preventing infection.

Therefore, to use CRISPR-Cas9 as a biotechnology resource, an RNA complementary to the target gene is the only element needed, the so-called guide RNA. The target gene will be recognized by the guide RNA and cleaved by Cas9, activating the error-prone cellular mechanism for DNA repair.

Up to date, this technology has been used in diverse fields, one of the greatest challenges being its clinical application. In particular, within the immunotherapy application, the use of CRISPR-Cas for editing T cells in cancer has achieved promising results.

However, CRISPR-Cas9 shows some limitations. In fact, one of the main problems is the onset of unwanted mutations, known as “off-target” events.

On the other hand, immunotherapy based on modified T-cells, also appears as a hopeful and innovative tool. It has been widely developed in the last decade, having been recently approved by FDA as a treatment in patients with acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cells lymphoma. Nonetheless, the tumorous cells usually evade the action of T-lymphocytes. One of the main challenges is therefore to optimize its function, which can be achieved by gene editing with CRISPR.

Objectives:

- **Primary endpoint:** to evaluate safety, viability, and efficacy of CRISPR-edited T cells in cancer patients
- **Secondary endpoints:** to evaluate the treatment extrapolation as well as to analyze current limitations and further challenges of this therapy.

Methods:

Information was mainly obtained in Pubmed Database with specific keywords. The articles considered for this review, were selected using clearly established inclusion and exclusion criteria. To extract the relevant data of each study, a table showing the main characteristics in both reports was made. Next table summarizes the main results of both studies together. The methodology employed was based on PRISMA guide and Cochrane handbook guidelines, and an evaluation of the risk of bias was carried-out. Finally, Doctor Francis Mojica accepted an interview, providing an insight of the early years of CRISPR discovery, by the hand of one of the researchers that described this bacterial defense system for the first time.

Results:

Two phase-1-clinical trials were selected and further analyzed. On the one hand, Lu et al. (2020), made PD-1 disrupted gene T cells by CRISPR, which were subsequently infused in twelve patients with refractory non-small-cells-lung cancer. On the other hand, Stadtmauer et al. (2020), made a multiplex genome editing in three loci: TRAC, TRBC and PDCD1. In this last case, sample was made by three patients, two of them with multiple myeloma and the third one with an advanced sarcoma.

Both studies achieved their primary endpoint: to demonstrate safety and feasibility of the therapy. In fact, safety was determined by the absence of severe adverse events. Mostly, side effects were mild and reversible. Furthermore, the frequency of off-target events was low in both cases, which allows to reaffirm safety. On the other hand, viability was showed by measuring edited T cells persistence in peripheral blood of the enrolled patients. In this way, both studies observed a stable *in vivo* T cells persistence of 8 to 52 weeks and 13 to 39 weeks, respectively.

Finally, regarding clinical outcomes, it is important to point that in the Lu et al. study, two of twelve patients achieved a stable disease for 8 weeks. One of them showed a control of disease during 76 weeks after the first infusion. Stadtmauer et al., also observed a stable disease in two of the three patients enrolled. One of them even showed a tumor regression but with a subsequent onset of new lesions.

Discussion and conclusions:

The primary aim was to evaluate safety, viability and efficacy of T-cells based immunotherapy using CRISPR editing tool. The two clinical trials reviewed, showed safety and feasibility of edited T cells with CRISPR-Cas9. Severe adverse events were not reported and most of them disappear over time. Editing efficiency was optimal, which was determined by the low frequency of off-target events; thus, overcoming one of the main limitations of CRISPR-Cas systems. On the other hand, the durability of the therapy was satisfactory, observing a stable persistence of the edited cells in the long term. Nevertheless, efficacy was not demonstrated in none of the clinical trials. In fact, none of the patients showed a significant tumor regression and all of them finally underwent disease progression.

Therefore, the fact that this therapy is a safe and viable option, encourage further studies. CRISPR may represent a cure of a wide range of diseases. Some authors claim that this could even lead to the eradication of inherited genetic pathologies. This would pose new challenges of an increasingly aging population.

Finally, ethical issues raised by CRISPR cannot be ignored. Where should we set the limits? Is it ethical to apply this technology in human germline? Large multidisciplinary teams capable of answering these questions are therefore needed.

In summary, CRISPR edited T cells is a safe and viable therapy in patients with refractory cancer. However, further studies with different gene targets to be edited, wider samples and comparative control groups, are needed to evaluate its efficacy an extrapolate results.

INTRODUCCIÓN

SISTEMAS CRISPR-Cas

CRISPR-Cas (“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”) constituye un sistema inmunitario adaptativo y heredable de algunas especies de bacterias y arqueas contra virus bacteriófagos y otros elementos extraños. Su mecanismo biológico alberga una gran complejidad y, a pesar de haber sido estudiado minuciosamente en los últimos años, todavía suscita muchas preguntas (1).

Este sistema de defensa en procariotas consiste en unas secuencias repetidas y palindrómicas propias de la bacteria (2), separadas de forma regular por espaciadores, que contienen el material genético de bacteriófagos y plásmidos potencialmente dañinos (3). De este modo, CRISPR actúa como un registro de infecciones pasadas que inmunizan al huésped ante una próxima infección. Adicionalmente, en conjunción con CRISPR, participan unos genes que codifican las proteínas Cas, un tipo de nucleasa esencial para mediar la inmunidad (4).

Historia del descubrimiento del sistema CRISPR

Hasta hace poco más de 10 años, apenas se hablaba de CRISPR ni de su impacto en la ciencia. No obstante, la primera vez que se insinuó su existencia fue en 1987, cuando unos microbiólogos japoneses, estudiando el gen responsable de la conversión de la fosfatasa alcalina en el genoma de *Escherichia Coli*, descubren una secuencia de DNA repetida que reportan en su artículo como “An unusual structure was found in the 3'-end flanking region of iap. Five highly homologous sequences of 29 nucleotides were arranged as direct repeats with 32 nucleotides as spacing” (2). En aquel momento no se disponía de los recursos científicos ni tecnológicos necesarios para estudiarlo en profundidad, por lo que no se le dio mayor significado a este hallazgo. En la misma época, otros investigadores holandeses descubren unas secuencias similares en el genoma de algunas especies del género *Mycobacterium* (5).

Años más tarde, en 1993, el microbiólogo alicantino Francis Mojica, mientras estudiaba en su tesis doctoral los mecanismos que permitían a determinadas arqueas halófilas vivir en ambientes extremos, descubrió en el genoma de *Haloferax mediterranei* las curiosas repeticiones reportadas unos años antes por sus colegas japoneses (6).

En 2003, llega el momento definitivo para la historia de CRISPR. Mojica y su equipo, constatan que los espaciadores que se encuentran entre las repeticiones del genoma de procariotas tienen enormes similitudes con el genoma de bacteriófagos.

Pero además, observan que aquellas bacterias y arqueas que tienen esta particularidad son resistentes a infecciones por estos virus, es decir, descubren la función de CRISPR como sistema inmunitario de

organismos procariotas. En aquel momento, estos hallazgos no fueron reconocidos y su publicación fue incluso rechazada en varias revistas (7). No se publicó hasta 2 años después, en 2005 (3). Hubo que esperar un año más tarde para que Makarova *et al.*, describieran la relación entre CRISPR y las proteínas Cas, así como la función de estas últimas (4).

En 2007, otro grupo pone definitivamente a prueba el sistema inmunitario procariota ya descrito, introduciendo determinadas secuencias de bacteriófagos en el genoma de *Streptococcus termophilus*, observando, en efecto, cómo la bacteria adquiriría resistencia (8).

Más adelante, en 2012, las investigadoras Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, publicarían un estudio por el que en 2020, obtendrían el premio Nobel de química (9). Esto supuso un paso más hacia la lucha contra el “efecto Matilda”, término acuñado en 1993 por la historiadora Margaret W. Rossiter, para visibilizar la discriminación e infravaloración de las aportaciones hechas por mujeres en distintos campos de conocimiento (10). Así pues, en su artículo, Doudna y Charpentier no solo describieron la función de CRISPR sino que además, demostraron como el sistema CRISPR-Cas 9 puede ser utilizado como herramienta de edición genética, proponiendo su posible aplicación para modificar el genoma celular, de forma relativamente rápida y sencilla. Al mismo tiempo, el lituano Virginijus Siksnys también realizó un estudio con resultados similares al de sus compañeras (11). No obstante, su estudio fue publicado unos meses más tarde (12), por lo que no obtuvo un reconocimiento de tanta magnitud como el de las investigadoras.

Finalmente, el neurocientífico Feng Zhang , fue el primero en demostrar la aplicación de esta herramienta de edición genética en células humanas (13). Por otro lado, el grupo del genetista Church también elaboró un estudio con resultados parecidos (14). Ambos artículos serían publicados en 2013, en el mismo número de la revista *Science*.

A raíz de ahí, los sistemas CRISPR-Cas han captado de forma significativa la atención de toda la comunidad científica, con la consiguiente publicación de una enorme variedad de estudios en diversos campos.

Generalidades y mecanismos

Además de CRISPR, existen dos tecnologías de edición genética que ya habían sido utilizadas con anterioridad: ZNF (“zinc-fingers nucleases”) y TALEN (“Transcription activator-like effector nuclease). Estas dos estrategias actúan mediante nucleasas quimeras capaces de reconocer específicamente una región concreta de DNA. Sin embargo, la elaboración de ZNF y TALEN no solo es mucho más cara sino también más laboriosa. Cas9, en cambio, es capaz de ejercer su acción de corte en cualquier punto del genoma, mediante el diseño de un RNA guía complementario a la secuencia del gen diana.

Por tanto, las ventajas de CRISPR-Cas con respecto a otros métodos de edición genética han quedado claramente definidas (15) (**Anexo Tabla 1**).

Los sistemas CRISPR-Cas se dividen en dos clases, subdivididas en diferentes tipos. Los sistemas de clase 1 (tipos I, III y IV) actúan a través de múltiples complejos de proteínas Cas, mientras que los sistemas de clase 2 (tipos II, V y VI) sólo necesitan una única proteína efectora (16,17). De entre todos ellos, los más utilizados en ingeniería genética han sido los de clase 2 en general, y el de tipo II/CRISPR-Cas9 en particular.

El proceso de inmunidad en bacterias y arqueas, mediado por el sistema CRISPR-Cas, consta de 3 fases: adaptación, expresión e interferencia. Durante la adaptación, el material extraño derivado de una infección vírica o por plásmido es reconocido, cortado e integrado en el genoma del huésped a través de las proteínas Cas1 y Cas2. Cabe señalar que el genoma foráneo, conocido como protoespaciador, se integra a intervalos regulares y separados por secuencias repetidas de DNA palindrómico. A continuación, la transcripción y expresión del clúster CRISPR da lugar a diferentes moléculas de RNA conocidas como crRNA (CRISPR-RNA). Finalmente, ante una segunda infección, se pone en marcha el estadio de interferencia, donde el crRNA maduro actuará de guía para que las proteínas Cas reconozcan y corten el DNA foráneo (18) (**fig.1**).

Cabe destacar que, adyacente a los protoespaciadores del genoma viral, existen unas secuencias de tres nucleótidos conocidas como PAM (“Protospacer Adjacent Motif”). Cas9 sólo cortará las secuencias adyacentes a PAM, lo que evita que se produzcan cortes erróneos en la secuencia CRISPR, que recordemos es complementaria a la secuencia diana del genoma invasor. PAM es por tanto un mecanismo evolutivo que evita los procesos de autoinmunidad (19, 20).

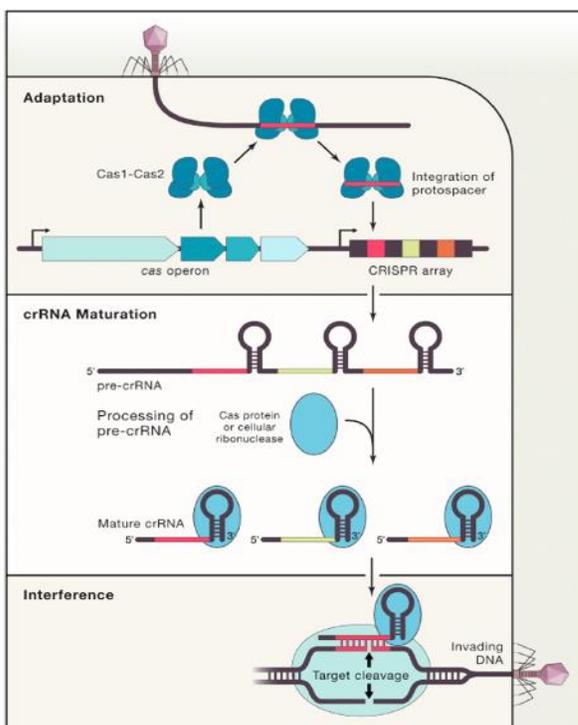


Fig.1. Las 3 fases de la inmunidad CRISPR. Esquema que muestra las fases de adaptación, expresión e interferencia del sistema CRISPR-Cas. En la fase de interferencia, los sistemas de clase 1 utilizarán complejos multiproteicos mientras que los de clase 2, usarán una única proteína efectora (obtenido de Charpentier *et al.*, 2018)

CRISPR-Cas9 como herramienta biotecnológica

Probablemente por su versatilidad y sencillez, el sistema CRISPR-Cas de tipo II ha sido el más utilizado como herramienta de edición del genoma. La fase de interferencia de este sistema requiere la participación de la endonucleasa Cas9. Además del crRNA, Cas9 necesita para su funcionamiento a un tercer elemento conocido como crRNA transactivador (tracrRNA). Este RNA dual (crRNA-TracrRNA), se unirá junto a Cas9 a las regiones de DNA “diana” con las que tenga complementariedad. Una vez reconocido el DNA foráneo, Cas9 generará un corte de doble cadena o DSB (del inglés “Double-strand break”). Esto es posible gracias a dos dominios fundamentales de Cas9, HNH y RuvC-like que cortan la hebra complementaria y no complementaria, respectivamente (21) (**Fig.2**).

La aplicación de este sistema como herramienta biotecnológica se consigue mediante la fusión de crRNA y tracrRNA en lo que se conoce como sgRNA (“single-guide RNA”) (**Fig.3**). Esto es precisamente lo que describieron Charpentier y Doudna en el artículo comentado anteriormente.

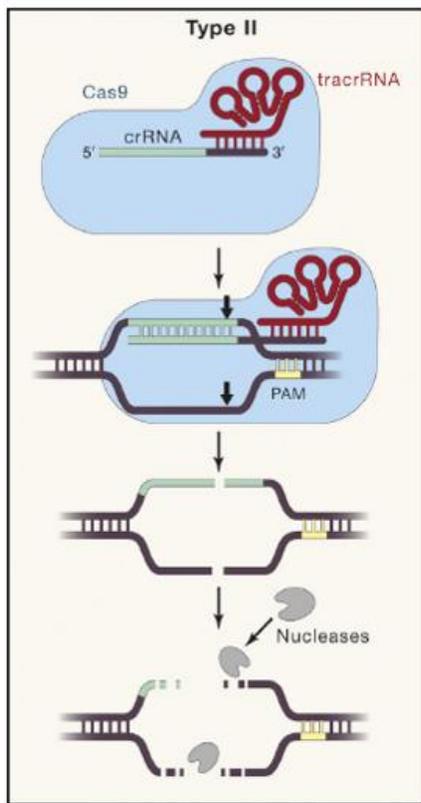


Fig.2. Proceso de interferencia de CRISPR-Cas9. El complejo formado por Cas9 (azul), crRNA(verde) y tracrRNA (rojo) se une al DNA diana proximal a una región PAM. La complementariedad entre el crRNA y el DNA diana generará un corte de doble cadena por parte de Cas9, y en concreto, por sus dominios HNH y RuvC que cortaran la hebra “diana” y la hebra “no diana” respectivamente (Charpentier *et al.*, 2018).

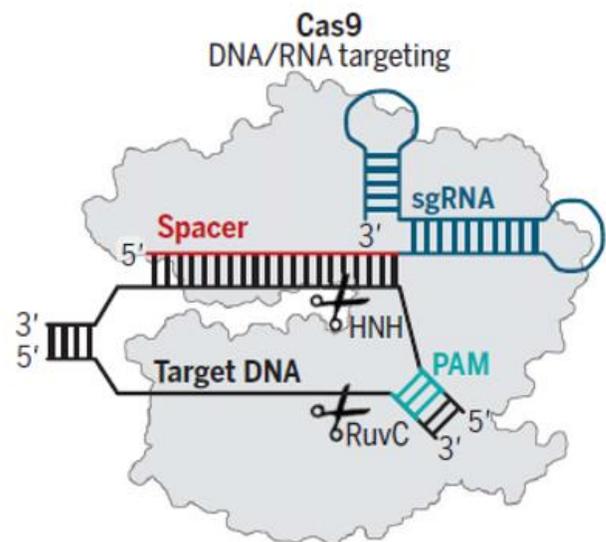


Fig. 3. Esquema de función CRISPR clase 2 tipo II (CRISPR-Cas9) como herramienta de ingeniería molecular. Se observa un sgRNA (en azul) que codifica un espaciador (en rojo) unido a un DNA diana de doble cadena, proximal a una región PAM. El correcto emparejamiento de bases activa los dominios HNH y RuvC de la nucleasa Cas9 generando un corte de las dos hebras de DNA (Doudna *et al.*, 2018)

Una vez formados los cortes de doble cadena, la reparación de DNA puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos principales: NHEJ (“non-homologous end joining”) o HDR (“homology-directed repair”). El primero de ellos es predominante y suele conducir a errores, generando inserciones o deleciones que pueden resultar útiles para la inactivación de genes (“knockout” genético). Por otro lado, el segundo, más sofisticado, permite una reparación más precisa mediante la incorporación de una secuencia de DNA exógeno en el lugar de corte (22) (**Fig.4**) . De este modo, uno de los retos de CRISPR-Cas es mejorar la eficiencia de las nucleasas que actúan a través de HDR, con el fin de optimizar y afinar el proceso de edición genética (23, 24)

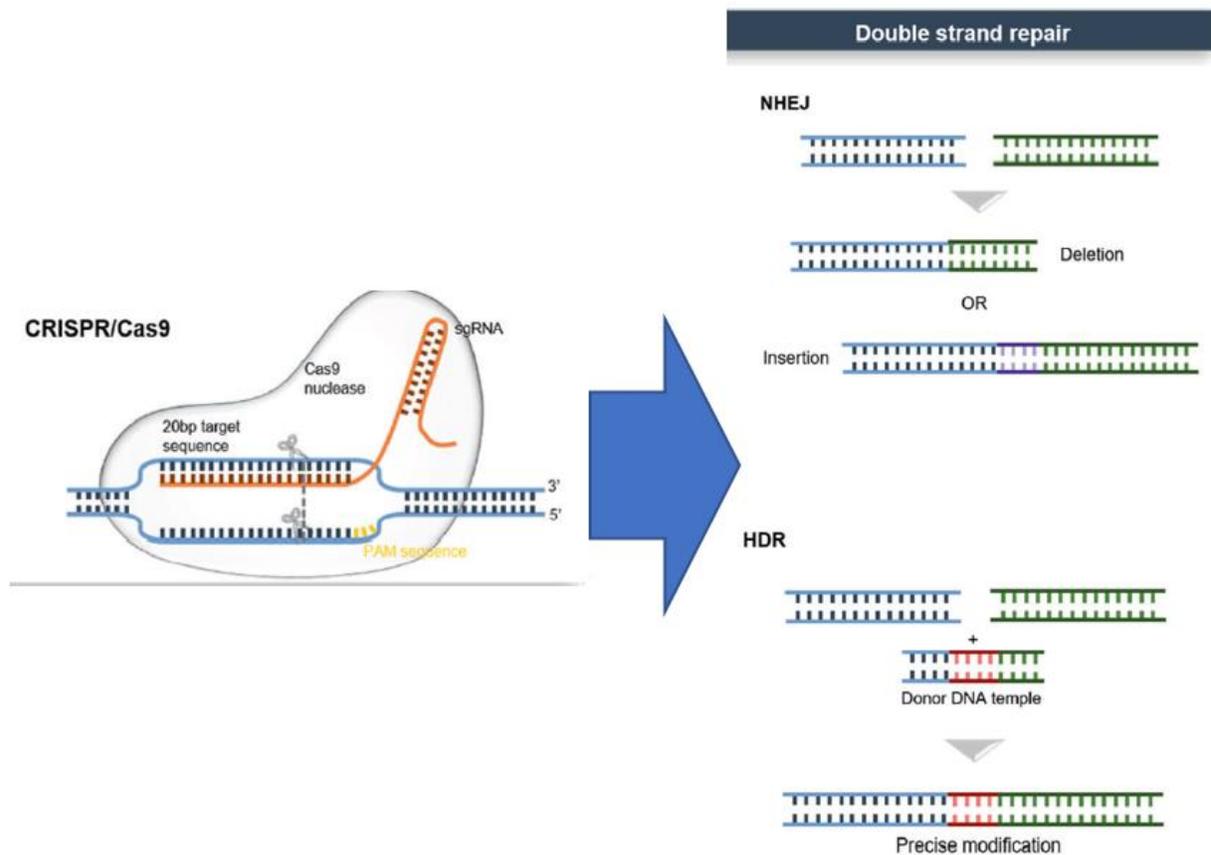


Fig.4. Mecanismos de reparación de los cortes de doble cadena (“Double Strand Breaks” /DBS). Existen dos métodos de reparación tras un corte de doble cadena de DNA. El mecanismo “NHEJ”, lleva a cabo inserciones o deleciones en la secuencia de corte. Por otro lado, a través del mecanismo “HDR”, en presencia de un molde de DNA de un donante, se pueden llevar a cabo correcciones o ediciones genéticas más precisas y en el sitio deseado (Li et al., 2020).

Aplicaciones biomédicas

La tecnología CRISPR-Cas ha sido aplicada en un amplio rango de tipos celulares y organismos. Asimismo, una de las mayores aspiraciones de esta herramienta radica en su aplicación clínica (21).

En la última década, se han llevado a cabo múltiples ensayos preclínicos. Como ejemplo, un estudio demostró cómo la disrupción del gen PCSK9 a través de spCas9, resultaba en una reducción de LDL en ratones, abriendo la puerta a futuros avances en la prevención de enfermedades cardiovasculares (25).

Por otra parte, se han logrado resultados alentadores en modelos experimentales de distrofia muscular de Duchenne. Uno de ellos utilizó CRISPR-adenovirus asociado (AAV) y observó una clara mejora de las funciones cardíacas y esqueléticas en los ratones enfermos (26). En la misma línea, otros dos grandes estudios consiguieron corregir con CRISPR las mutaciones en células humanas y animales del gen de la distrofina, dando un gran paso hacia la posible cura de esta grave patología neuromuscular (27,28)

Por otro lado, también se logró en otro estudio la recuperación parcial de visión en modelos animales de retinitis pigmentosa (29). Además, en el campo de la oftalmología también se ha conseguido la reparación de un gen mutado en la amaurosis congénita de Leber (30). De hecho, recientemente se ha realizado una primera aproximación terapéutica en un paciente con esta enfermedad. No obstante este ensayo clínico está todavía en proceso y, por el momento, no se han publicado resultados (31).

Recientemente, en enero del 2021, *The New England Journal of Medicine* publicó un ensayo clínico que reportaba los resultados de dos pacientes con anemia de células falciformes y Beta-talasemia, tratados con células madre hematopoyéticas editadas mediante CRISPR. Esto supone un gran avance para el desarrollo de futuras terapias curativas contra enfermedades hematológicas (32).

Por último, uno de los mayores avances clínicos que se ha realizado con CRISPR-Cas ha sido en el ámbito del cáncer. Se ha logrado identificar y silenciar genes relacionados con el pronóstico de algunos tipos de cáncer, así como con la resistencia de estos a determinados tratamientos (33,34). Esta estrategia ha permitido también elaborar, entre otros, modelos tumorales de leucemia mieloide (35) y cáncer colorrectal (36), con el fin de poder estudiar más en profundidad los complejos mecanismos genéticos subyacentes. Además, la aplicación de CRISPR ha conseguido optimizar, tanto en modelos experimentales como en humanos, la función de una de las terapias más prometedoras en el futuro del cáncer: la terapia con células CART y TCR. Más adelante comentaremos detalladamente los estudios realizados en la inmunoterapia y, tras ello, procederemos a presentar los de mayor interés para nuestra revisión sistemática.

Limitaciones de los sistemas CRISPR-Cas: efectos “off target”.

A pesar de sus evidentes beneficios, los sistemas CRISPR-Cas tienen también una clara desventaja y es que pueden generar mutaciones no deseadas, conocidas en inglés como “off-target”. La especificidad de CRISPR/Cas9 está definida por la secuencia de 20 nucleótidos del sgRNA y las regiones PAM adyacentes al DNA reconocido. Durante este proceso de reconocimiento, se pueden tolerar hasta 3 errores de apareamiento (“mismatch”). No obstante, cuando se supera esta cifra, es cuando aparecen los efectos “off target” (37) (**Anexo fig.1**).

Este problema tiene especial relevancia para la aplicación clínica de CRISPR debido al aumento de riesgo mutagénico y la consiguiente aparición de efectos perjudiciales, entre los cuales cabría mencionar la activación de oncogenes en células animales. De este modo, se están desarrollando diversas estrategias para prevenir y mitigar estos efectos indeseables (38). Dichas estrategias se basan en los siguientes objetivos:

- Optimizar la especificidad del sgRNA (39).
- Optimizar la especificidad de las variantes Cas (40).
- Elaborar variantes Cas inducibles en presencia de un estímulo determinado con el fin de regular su acción de corte (41, 42).
- Optimizar los sistemas de entrega de CRISPR-Cas: Los sistemas de transferencia biológicos como vectores derivados de AAV, hacen que el sistema CRISPR-Cas permanezca durante más tiempo en las células aumentando el riesgo de efectos indeseables. No obstante, si el sgRNA y las Cas9 se transfieren directamente como una ribonucleoproteína (RNP), el periodo ventana de edición genética se acorta y por consiguiente, se reducen los efectos off-target (43).

INMUNOTERAPIA

El tratamiento del cáncer sigue siendo actualmente uno de los grandes retos de la investigación biomédica. Las terapias convencionales como la radioterapia, quimioterapia y cirugía, si bien resultan efectivas en muchos casos, suelen conllevar efectos secundarios considerables. Por otro lado, algunos tumores son refractarios a estas. En este sentido, la inmunoterapia ha supuesto el inicio de una nueva era en el campo de la oncología.

La inmunoterapia antitumoral celular, se divide en tres modalidades: linfocitos infiltrantes de tumor (“Tumour infiltrating lymphocytes” o TILs), células T modificadas genéticamente para expresar receptores T alfa/beta (TCRs) y finalmente, células T que expresan receptor de antígeno quimérico (CART) (44).

Por un lado, las TILs son células T reclutadas del tejido tumoral del paciente, cultivadas *ex vivo* junto a citocinas que facilitan su expansión y, posteriormente, inoculadas nuevamente al huésped. Esta terapia ha mostrado buenas respuestas en el melanoma (45). No obstante, presenta algunas limitaciones ya que el crecimiento de estas en el medio cultivo suele ser pobre. Además de ello, la identificación de antígenos T específicos en algunos tumores puede resultar compleja. Sin embargo, las células CAR y TCR modificadas genéticamente, son capaces de expresar el receptor deseado contra un antígeno específico, evitando así las carencias de la terapia con TILs (46).

La principal diferencia entre las células TCR y CART es que las primeras reconocen péptidos unidos al HLA, pudiendo identificar antígenos tanto de superficie como intracelulares. Esto supone una ventaja al ofrecer la capacidad para reconocer una amplia gama antigénica. Sin embargo, algunos tumores consiguen evadir la respuesta inmunitaria a través del silenciamiento del HLA. Esto último puede evitarse con el empleo de las CART que reconocen al antígeno de forma HLA independiente (47) (**Fig.5**).

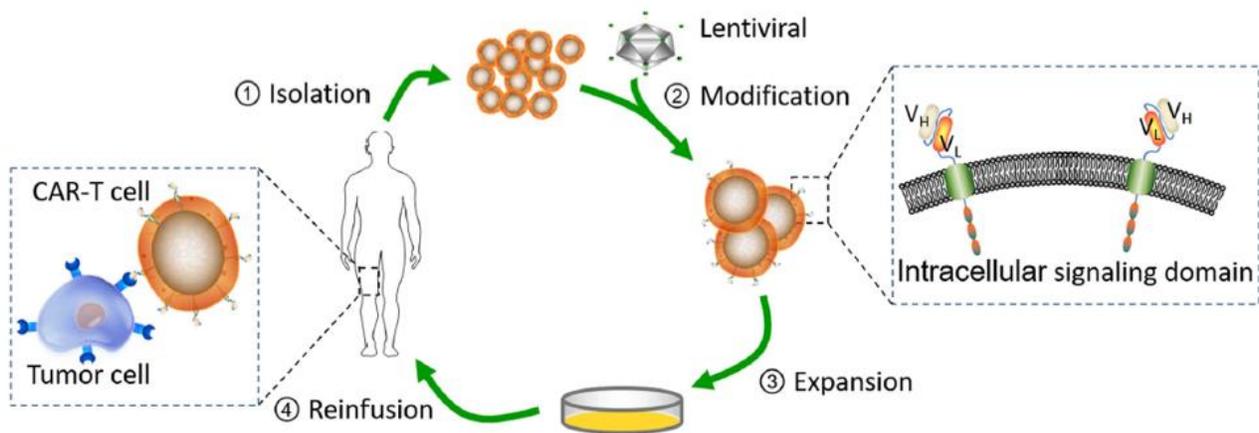


Fig. 5. Inmunoterapia con células CART (Pang et al. (58)). La terapia con células CART se divide en 4 pasos principales: 1) Las células T son aisladas de la sangre periférica del paciente. 2) Las células T son activadas y modificadas mediante la incorporación del receptor CAR. 3) Las células obtenidas se cultivan *ex vivo* para incrementar su número. 4) Las células son infundidas de nuevo al paciente (Pang *et al.*, 2018).

Células CART: generalidades y estructura

Desde el 2011, los datos clínicos presentan a las CART como terapias potencialmente curativas para tratar neoplasias hematológicas, mostrando altas tasas de respuestas completas en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas (LAL) y crónicas (LLC) (48-51), así como con linfoma difuso de células B (LDCB) (52,53). Estos prometedores resultados condujeron a la reciente aprobación por la FDA de las CART dirigidas contra el antígeno CD19, como tratamiento para la LAL y el LDCB, reconocido con el nombre de Kymriah (54).

Básicamente, los receptores de antígeno quiméricos CAR se encargan de traducir el reconocimiento de un antígeno específico en una cascada de señales que activan las funciones efectoras de las células T. Sus componentes fundamentales son los siguientes (55) (**Fig.6**):

- Un dominio extracelular de unión al antígeno, que suele corresponder a una cadena simple de fragmento variable de anticuerpo (scFv).
- Un dominio transmembrana que ancla el receptor a la superficie celular (dominio “bisagra”).
- Dominios de señalización intracelulares (dominios de coestimulación).

A lo largo de esta última década, se han ido desarrollando nuevas generaciones de células CART con el fin de optimizar cada vez más su función. Se han elaborado hasta la actualidad 4 generaciones (56): la primera contiene un único dominio de señalización intracelular CD3 ζ ; la segunda y tercera generación incluyen además varios dominios de coestimulación, mejorando así la proliferación, citotoxicidad y duración de la respuesta; finalmente, en la cuarta generación, se añaden citocinas o ligandos a las anteriores (IL-12, IL-18, CD40,41BBL, etc.) para lograr una mayor eficacia y durabilidad (57).

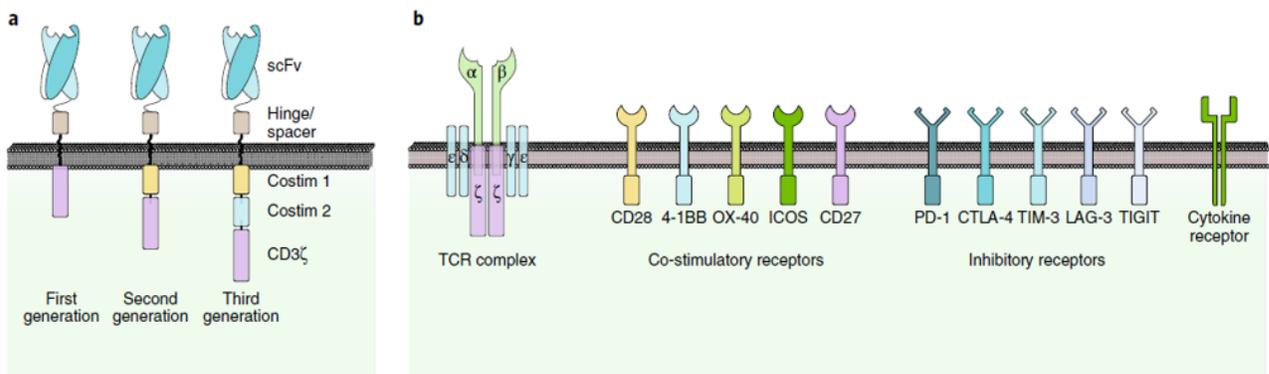


Fig.6. Estructura de CART y TCR. **a)** los CARs están formados por un dominio extracelular como scFV, un dominio transmembrana y bisagra que ancla el receptor a la superficie celular y finalmente, un dominio intracelular que activa a las células T. Las diferentes generaciones de CAR han ido incorporando cada vez más dominios de coestimulación. Aquí solo se muestran las generaciones 1,2 y 3 pero existen 4 generaciones en total. **b)** los complejos TCR se componen de cadenas α y β variables asociados con un dominio CD3 invariable. La activación de las células T requiere la participación del TCR y los dominios de coestimulación. Las citocinas son importantes para generar diferenciación y memoria inmunitaria. Finalmente, los receptores inhibitorios, permiten regular su respuesta. (Labanieh *et al.*, 2018).

Limitaciones y retos de las CART

A pesar de los beneficios claramente demostrados de las células CART, también se han relatado algunas limitaciones, principalmente relacionadas con su eficacia y seguridad. De este modo, a lo largo de estos años, se han propuesto diversos métodos para superar estas barreras. A continuación se comentan brevemente los aspectos dónde más se ha incidido para perfeccionar esta terapia.

- **Seguridad:** se han descrito toxicidades asociadas a la terapia con CART, algunas de ellas graves. Los efectos adversos más frecuentemente relatados son: síndrome de liberación de citocinas, síndrome de distrés respiratorio agudo y neurotoxicidad (58,59).

- **Eficacia:** una correcta función de las CART radica en su capacidad para generar memoria y persistir *in vivo* tras la eliminación del tumor, asegurando una protección duradera. Desafortunadamente, el microambiente tumoral impide en muchas ocasiones alcanzar dichos objetivos. De hecho, el tumor suele evadir el sistema inmunitario mediante sistemas sutiles y variopintos. Todo ello dificulta la acción de las CART en el proceso de identificación y eliminación del cáncer. A continuación enumeraremos los mecanismos principalmente afectados por este microambiente tumoral (60):
 1. Circulación: la circulación de las células T hacia los antígenos diana es un proceso complejo determinado por moléculas de adhesión, citocinas y sus respectivos receptores. Algunas de las células CART no expresan estos receptores de la forma adecuada. Así, se ha visto que una forma de optimizar la migración de las células T hasta el tumor es modificando la expresión al alza de los receptores necesarios (61,62).
 2. Expansión y persistencia: para su activación las CART necesitan 3 señales. En la primera y la segunda, intervienen los dominios de unión al antígeno y de coestimulación. La tercera señal, está relacionada con la unión de determinadas citocinas necesarias para la expansión celular. Así es como nacen las CART de cuarta generación (63,64).
 3. Estroma y tejido de soporte tumoral: el tumor es capaz de “engañar” a algunas células para que le proporcionen el sostén necesario, participando en la formación de su matriz extracelular. Una forma de contrarrestar esto es dirigirse contra estas células e inhibir su función. (65).
 4. Puntos de control inhibitorios de las células T: las células T expresan, de forma fisiológica, unos receptores conocidos como “checkpoints” o puntos de control inhibitorios. Los más conocidos son PD-1, CTLA-4, LAG-3 y TIM-3. De esta forma, la respuesta inmunitaria puede estar regulada, evitando mecanismos de autoinmunidad. El microambiente tumoral aprovecha precisamente este sistema para secretar ligandos específicos de estos receptores, inhibiendo así, la función de las CART.

A raíz del descubrimiento de este método de evasión tumoral, se desarrollaron numerosas investigaciones que mostraron una mayor eficacia citotóxica de las CART o de las células T endógenas mediante el bloqueo de los mencionados “checkpoints”. Asimismo, se demostró una mayor expansión de células T y, por tanto, una mayor respuesta antitumoral tras la administración de un anticuerpo anti-PD-1 en un paciente con linfoma difuso de células B (66). También se encontraron resultados alentadores en el cáncer de pulmón no microcítico avanzado, entre otros (67). No obstante, el bloqueo de estos receptores a través de anticuerpos, también se ha asociado a la aparición de efectos adversos graves en algunos pacientes (68). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de otras alternativas más seguras y eficaces como las herramientas de edición génica que comentaremos más adelante.

CRISPR-Cas y CÉLULAS T EN LA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER

Una vez conocidas las funciones y los límites de las células CART, resulta evidente la necesidad de una herramienta que permita no sólo perfeccionar esta terapia en diversos aspectos, sino poder hacerlo a un menor coste para que sea accesible a toda la población. En este punto es dónde entran en juego los sistemas de edición genética y en concreto, CRISPR-Cas.

Actualmente, para la inmunoterapia se utilizan células T autólogas, por lo que para su elaboración, se requiere un proceso considerablemente costoso, tanto en tiempo como a nivel económico. Por consiguiente, el acceso del tratamiento a la población general está circunscrito a grupos muy reducidos de pacientes. Otra de las desventajas es que, en diversas ocasiones, no consiguen reclutarse suficientes células T debido a la linfopenia que presenta el paciente, ya sea por terapias previas o bien por la propia enfermedad subyacente (69).

Por este motivo, uno de los grandes retos de la inmunoterapia es la fabricación de células T universales, disponibles en cualquier momento para su uso inmediato. Esto es lo que se conoce como “off-the-shelf” CART (**Fig.7**). Para lograr dicho objetivo, se necesitarían células alogénicas de donantes sanos que serían, a continuación, modificadas en función de las necesidades requeridas. No obstante, el uso de células alogénicas plantea un problema mayor, que es la reacción de injerto contra huésped; tanto el receptor endógeno T- $\alpha\beta$ como el haplotipo HLA pueden provocar rechazos inmunológicos graves. De este modo, varios estudios han aplicado el sistema CRISPR-Cas para hacer un “knockout” genético de la cadena β del TCR y de la $\beta 2$ -microglobulina, una porción del HLA-1(70). Gracias a ello, se ha logrado una primera aproximación para la elaboración de células T universales. A pesar de todo, debe tenerse en consideración que el bloqueo de HLA-1 de las células T, puede hacer que estas no sean reconocidas como células propias,

dando lugar a posibles mecanismos de autoinmunidad. Las células Natural Killer (NK) son las que se encargan principalmente de la eliminación de las células T bajo estas circunstancias. Esto puede evitarse mediante dos mecanismos: o bien bloqueando los ligandos de las Natural Killer o bien sobreexpresando en las células T, formas no clásicas de HLA como por ejemplo, HLA-E (71).

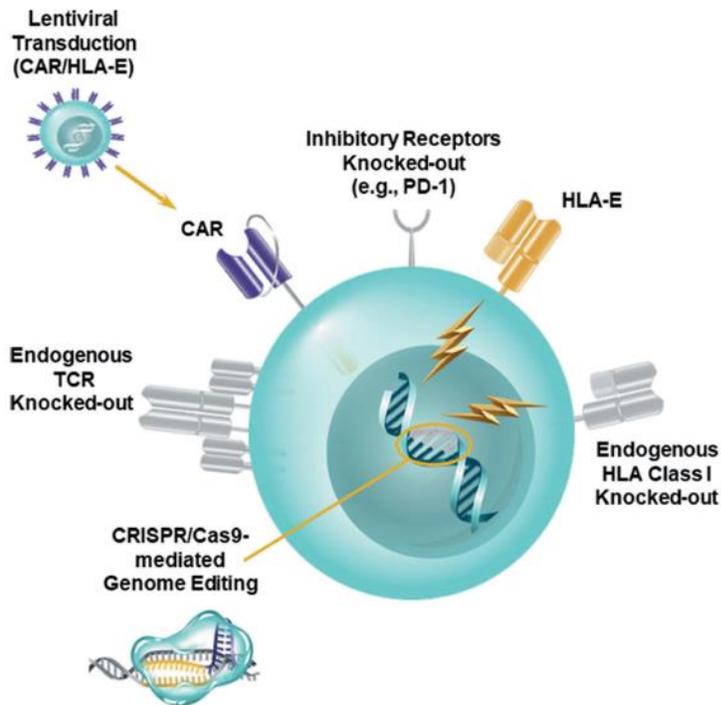


Fig7. Elaboración de células CART universales. La tecnología CRISPR/Cas9 puede ser usada para hacer una disrupción del TCR endógeno y de las moléculas HLA de clase I para evitar reacciones de injerto contra huésped tras la infusión de células CART. Por otro lado, esta herramienta de edición genética también permite hacer una disrupción de receptores inhibitorios como PD-1. Por último, la sobreexpresión de formas no clásicas de HLA clase I (como por ejemplo, HLA-E) evita el rechazo de las células CART alogénicas potenciando así su persistencia in vivo en los pacientes (Salas Mckee *et al.*, 2019).

Además de ello, CRISPR-Cas también permite facilitar el sistema de transferencia de genes a los receptores CAR. Así lo demostró un estudio en el que se introdujo el gen CD19 en el locus TRAC del receptor TCR (72).

Por último, la capacidad de CRISPR-Cas para modificar múltiples genes de forma simultánea, ha permitido además el bloqueo de los checkpoints inhibitorios anteriormente comentados (PD-1, LAG-3, TIGIT, etc.), evidenciando una mayor eficacia antitumoral de la terapia con CART (73-80). Estos buenos resultados captaron rápidamente la mirada de múltiples investigadores dando lugar a dos recientes ensayos clínicos publicados en las revistas *Science* y *Nature*. Se trata de los primeros estudios realizados con CRISPR-Cas en humanos, lo que ha abierto la puerta al futuro de la medicina. Nuestra revisión sistemática tiene como objetivo, precisamente, presentar los hallazgos de estos ensayos.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la seguridad, viabilidad, eficacia y, por consiguiente, la potencial aplicación del método CRISPR-Cas para optimizar la inmunoterapia en pacientes oncológicos, así como evaluar las posibles limitaciones y futuros retos de dicha herramienta. Todo ello con el propósito de presentar los últimos avances realizados en este innovador y revolucionario sistema.

Nuestra revisión pretende formular y responder las siguientes cuestiones, considerando la primera de ellas, la principal pregunta de investigación:

- ❖ **¿Es la aplicación de CRISPR una opción segura, viable y eficaz para mejorar la inmunoterapia en pacientes con cáncer?**
- ❖ ¿Se ha demostrado una mejoría clara de células T modificadas mediante CRISPR con respecto a los métodos estándar de edición genética utilizados previamente?
- ❖ ¿Tiene ventajas con respecto a otros tratamientos oncológicos convencionales?
- ❖ ¿Se ha observado una mejoría de la evolución de la enfermedad (supervivencia y calidad de vida) en los pacientes tratados con dicha terapia?
- ❖ ¿Existen limitaciones en el proceso? ¿Si es así, cuáles son y cómo se pretenden evitar en el futuro?
- ❖ ¿Sería este método accesible a la mayor parte de pacientes con cáncer?

JUSTIFICACIÓN

El cáncer constituye hoy en día una de las principales causas de morbimortalidad a nivel mundial. Los últimos datos actualizados en la plataforma GLOBOCAN de la OMS registraron en el año 2018, 18.1 millones de nuevos casos. Se estima que esta cifra ascenderá a 29.5 millones en el año 2040.

Por otro lado, de acuerdo con la SEOM, la estimación del número de cánceres diagnosticados en España para el 2020 fue de 277.394.

Por otra parte, en 2018, se calculó 9.6 millones de muertes relacionadas con el cáncer a nivel mundial. Según los datos publicados por la INE en 2019, los tumores constituyen la segunda causa de muerte en España (26,4% de los fallecimientos) después de las enfermedades cardiovasculares.

Además de ello, algunas de las terapias disponibles actualmente para combatir este conjunto de enfermedades (cirugía, radioterapia y quimioterapia), pueden asociarse a graves toxicidades que repercuten considerablemente en la calidad de vida del paciente, como, por ejemplo, la neutropenia febril (81).

Por último, cabe mencionar un estudio realizado recientemente por la AECC (Asociación Española Contra el Cáncer), que estima un impacto económico asociado al cáncer de 19.300 millones de euros cada año (1,6% del PIB) (82).

En definitiva, estos datos reflejan la necesidad de seguir desarrollando nuevas estrategias para luchar contra el cáncer. En este sentido, la inmunoterapia aparece como una posible puerta hacia el progreso, no solo en cuanto a la curación de la enfermedad sino también en cuanto al bienestar del paciente.

Cómo ya hemos comentado anteriormente, CRISPR y la inmunoterapia con células T, son por sí mismas, dos herramientas innovadoras y con un formidable potencial. De esta forma, combinando ambas técnicas, es esperable observar una sinergia considerable.

Es precisamente ese paso hacia el futuro, hacia una revolución en la medicina, lo que ha motivado este trabajo. La finalidad de esta revisión sistemática es, por tanto, exponer las primeras aproximaciones terapéuticas realizadas en humanos con CRISPR y las células T usadas en la inmunoterapia.

MÉTODOS

La metodología aplicada en nuestra revisión sistemática está basada en la guía PRISMA y el manual Cochrane 5.1.0.

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD:

Tanto los sistemas CRISPR-Cas como la inmunoterapia, son herramientas relativamente jóvenes y, a pesar de que los estudios realizados al respecto han crecido considerablemente en la última década, su aplicación en ensayos clínicos aleatorizados está todavía en desarrollo. De esta forma, y debido a que nuestro principal objetivo es evaluar la utilidad de ambas terapias en el ámbito clínico, hemos decidido adoptar un enfoque restringido. Los criterios de elegibilidad para la selección de estudios fueron los siguientes:

a) Criterios de inclusión:

- Pacientes adultos de entre 18-70 años con cáncer refractario a tratamientos convencionales.
- Aplicación de la intervención de interés: células T editadas genéticamente mediante CRISPR-Cas e inoculadas en los sujetos de estudio.
- Ensayos clínicos de fase 1 o superior.
- Estudios publicados en los últimos 5 años.

b) Criterios de exclusión

- Ensayos preclínicos con modelos experimentales animales y/o xenoinjertos tumorales.
- Inmunoterapia que no incluya el sistema CRISPR.
- CRISPR en otros sistemas, no inmunitarios.
- Artículos de opinión.
- Estudios publicados hace más de 5 años.

FUENTES DE INFORMACIÓN

Las fuentes de información consultadas para nuestra revisión sistemática fueron las siguientes:

- **Base de datos Pubmed**, donde se realizó una primera búsqueda general para exponer los antecedentes del tema de estudio y, posteriormente, una búsqueda más concreta, centrada en la pregunta de investigación. El período de búsqueda fue iniciado el 20 de octubre de 2020 y finalizó el 15 de enero de 2021.
- **Conferencia virtual: “CRISPR-cas9 y su implicación en el futuro de la medicina”** organizada por la Sociedad Valenciana de Nefrología el 17 de diciembre de 2020.
- **Correspondencia con el doctor Francis Mojica** el 11 de marzo del 2021 (La entrevista puede leerse en la sección “material complementario”, al final de este trabajo).

ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Para la búsqueda de los estudios que se incluyeron en nuestra revisión sistemática, se utilizó la base de datos Pubmed. Concretamente, utilizamos diferentes combinaciones de términos MeSH, para evitar la omisión de artículos que pudieran resultar importantes para el estudio. Cabe señalar que en todos los casos se aplicó la modalidad de “advanced search” (búsqueda avanzada) y el operador booleano “AND” para optimizar el proceso de búsqueda. Por otro lado, los términos MeSH relacionados con la terapia CRISPR fueron restringidos como “tema principal de búsqueda” aplicando la modalidad “Restrict to Mesh Major Topic”:

- 1) La primera búsqueda incluyó los términos MeSH “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats [Majr]” AND “cancer” obteniendo 276 resultados. Aplicando los filtros “clinical trial” y “published in the last 5 years” los resultados se redujeron a 1 artículo.
- 2) La segunda búsqueda incluyó los términos MeSH “CRISPR-Cas systems [Majr]” AND “T cells” obteniendo 156 resultados. Aplicando los mismos filtros mencionados anteriormente obtuvimos 3 artículos.

- 3) Finalmente, utilizamos los términos MesH “CRISPR-Cas systems [Majr]” AND “immunotherapy” obteniendo 82 artículos que tras aplicar los filtros de las búsquedas anteriores se redujeron a 2. Cabe señalar que estos dos estudios ya se habían obtenido en la segunda búsqueda.

Por tanto, se obtuvo un total de 3 artículos. A continuación, se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión, quedando finalmente 2 artículos, ambos pioneros en el uso de CRISPR en humanos y publicados en el año 2020: “**CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer**” (Lu *et al.*, 2020) y “**Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer**” (Stadtmauer. *et al.*, 2020.)

SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS

En la página siguiente se expone un diagrama de flujo que resume la metodología aplicada para la selección de los estudios de nuestra revisión sistemática (**Fig.8**).

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS

Para la extracción de datos, elaboramos una tabla que resumía las características principales de cada estudio. A continuación hicimos un resumen exponiendo los dos artículos y sus respectivos resultados. Por último, con el fin de englobar los datos de ambos ensayos clínicos, hicimos una segunda tabla que agrupaba y comparaba los hallazgos más relevantes de cada uno. Esta última tabla nos permitió extraer las conclusiones de interés.

EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGO

Para evaluar el riesgo de sesgo de los estudios individuales, nos basamos en las pautas propuestas en el capítulo 8.5 del Manual Cochrane “Herramienta de la Colaboración Cochrane para evaluar el riesgo de sesgo”. De este modo, realizamos una tabla con las potenciales fuentes de sesgo de ambos estudios.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA Y SÍNTESIS DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA

El protocolo metodológico de nuestra revisión sistemática, se basó en los criterios propuestos por el manual Cochrane 5.1.0/Parte 1: Revisiones Cochrane, capítulo 4: “guía del contenido de un protocolo y una revisión Cochrane (sección métodos)”.

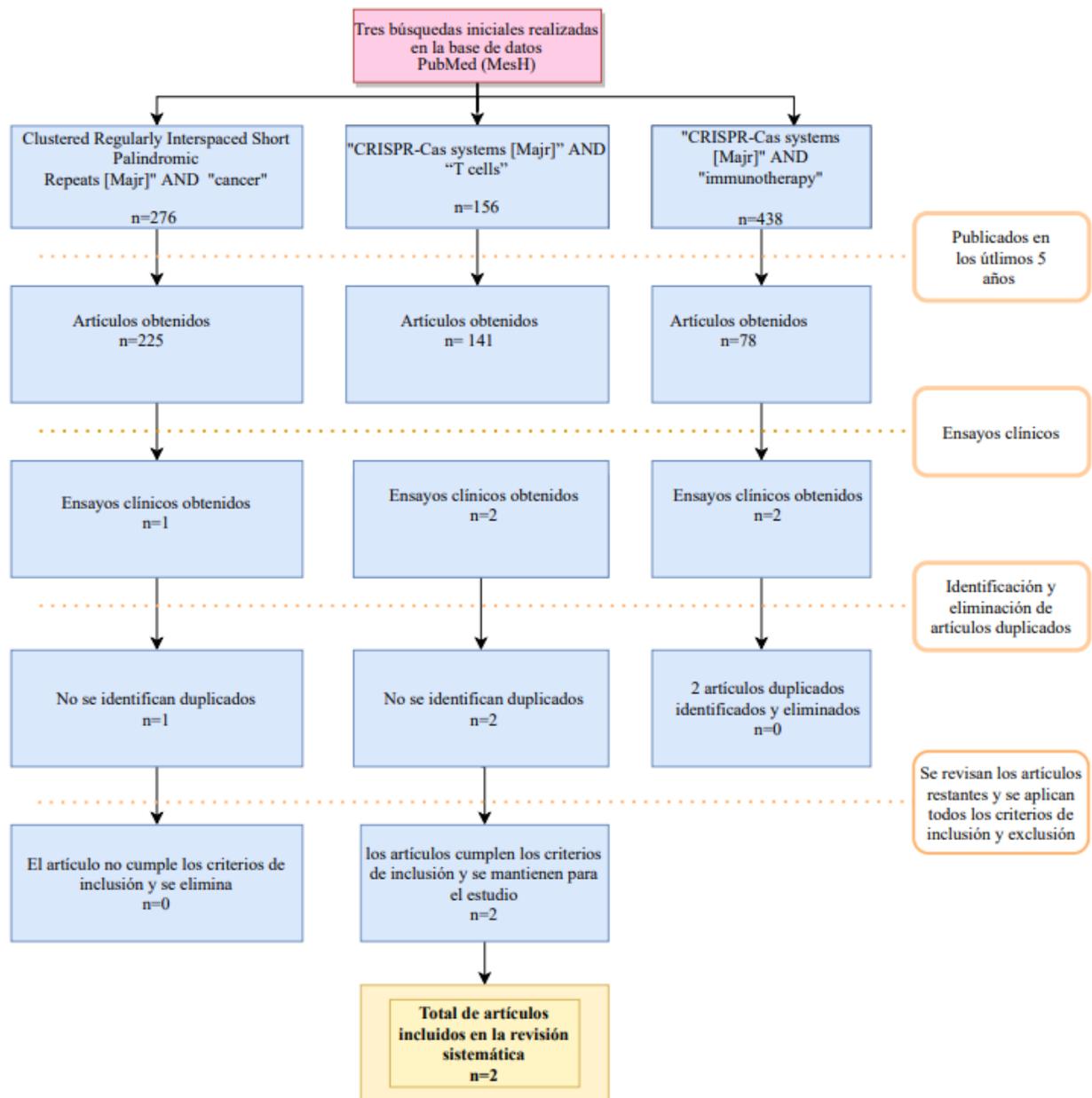


Fig.8. Diagrama de flujo que resume el proceso de selección de los estudios incluidos en nuestra revisión sistemática.

RESULTADOS

TABLAS RESUMEN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS REVISADOS

Tabla 1.a Resumen de las principales características del artículo 1 (Lu *et al.*, 2020) del estudio. *Score de 0-2 en la escala "Eastern Cooperative Oncology Group. **Síndrome de Liberación de Citocinas

Autor, año y País	Diseño de estudio y tamaño muestral	Objetivos	Características de la población	Seguimiento y pérdidas	Intervención	Variables medidas	Resultados	Conclusiones	Riesgo de sesgo
Lu <i>et al.</i> , 2020 China	Ensayo clínico en fase I, abierto, no aleatorizado Muestra inicial: n=22 Muestra final tratada: n=12	Objetivo principal: Evaluar la seguridad y factibilidad de células T editadas a nivel del gen PD-1 mediante CRISPR-Cas 9 en pacientes con cáncer de pulmón refractario. Objetivos secundarios: -evaluar la eficacia antitumoral de la terapia	4 cohortes: -Pre-A(n=2) -A(n=4) -B(n=3) -C(n=3) Muestra total: n=12 Criterios de inclusión: -edad:18-70 años -cáncer de pulmón no microcítico estadio IIIb o IV -tumor PD-L1 positivo -fracaso de ≥ 3 terapias previas -ECOG PS*: 0-2 -Esperanza de vida ≥ 3 meses	Duración del estudio: 26 de agosto 2016-21 de marzo 2018 (total: 18 meses y 23 días) Seguimiento tras la finalización estudio: 24 meses Pérdidas: un paciente de la muestra abandonó el estudio.	Terapia administrada: Inmunoterapia con células T editadas genéticamente mediante CRISPR-Cas9. Dosis administradas: -Pre-A: 2x10 ⁷ céls/kg -A, B y C reciben la dosis de forma escalonada: -1x10 ⁷ céls/kg -2x10 ⁷ céls/kg -4x10 ⁷ céls/kg Ciclos administrados: Cada ciclo consta de tres infusiones en los días 1,3 y 5 con dosis crecientes de células T (alcanzando el día 5 la dosis de 4x10 ⁷ céls/kg). Los ciclos se administran cada 28 días.	-Efectos adversos (EA) -Eficiencia de edición -efectos "off-target" (EOT). -Viabilidad de las células <i>T ex vivo</i> -Persistencia de las células <i>T in vivo</i> -Diversidad clonal de TCR periféricos -Tasa de control de enfermedad durante 8 semanas (TC8S) supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG)	EA: todos fueron de grado < 3. No se reportó ningún caso de SLC** Eficiencia de edición: óptima (correcta disrupción del gen PD-1) EOT (frecuencia media de mutación): 0.05 % . Viabilidad ex vivo: 77.3% . Diversidad clonal TCR: alcanzada en todos los pacientes. Persistencia in vivo: 8- 52 semanas. TC8S: 16.7% SLP: 7.7 semanas SG: 42.6 semanas.	La seguridad y viabilidad de la terapia administrada fueron claramente demostradas. Por otro lado, la frecuencia de eventos off-target fue baja. No obstante, las limitaciones de la metodología empleada, el pequeño tamaño muestral y la ausencia de un grupo control no permitieron obtener datos significativos acerca de su eficacia.	MODERADO: Es un estudio en fase I, abierto y no aleatorizado. No hay grupo control comparativo por lo que no puede determinarse la eficacia del tratamiento.

Tabla 1.b. Resumen de las principales características del artículo 2 (Stadtmauer *et al.*, 2020) **Síndrome de Liberación de citocinas.

Autor, año y País	Diseño de estudio y tamaño muestral	Objetivos	Características de la población	Seguimiento y pérdidas	Intervención	Variables medidas	Resultados	Conclusiones	Riesgo de sesgo
<p>Stadtmauer <i>et al.</i>, 2020</p> <p>Estados Unidos</p>	<p>Ensayo clínico en fase I, abierto, no aleatorizado.</p> <p><u>Muestra inicial:</u> n=6</p> <p><u>Muestra final tratada:</u> n=3</p>	<p>Objetivo principal: Evaluar la seguridad y viabilidad de la terapia con células T diseñadas para expresar NY-ESO y editadas con CRISPR-Cas9 en tres loci genéticos.</p>	<p>3 pacientes: -UPN35 -UPN39 -UPN07</p> <p>Muestra total: n=3</p> <p>Criterios de inclusión: -Pacientes con cáncer refractario que no hayan respondido a terapias previas (El resto de los criterios no se especifican).</p> <p>Otros datos de interés: -UPN35 y UPN07: mieloma múltiple avanzado y refractario -UPN39: sarcoma metastásico refractario.</p>	<p>Duración del estudio: No especificada. El estudio fue aprobado el 21 de junio del 2016 y publicado el 6 de febrero del 2020.</p> <p>Seguimiento: El seguimiento total de los pacientes fue de 2 años.</p> <p>Pérdidas: No hubo pérdidas durante el estudio.</p>	<p>Terapia administrada: Inmunoterapia con células T editadas genéticamente mediante CRISPR-Cas9.</p> <p>Otros datos de interés: La edición fue multigénica: en genes TRAC, TRBC y PDC1. El TCR también fue modificado para dirigirse específicamente contra el antígeno tumoral NY-ESO-1.</p> <p>Dosis administradas: 1x10⁸ células T editadas/kg</p>	<p>Efectos adversos (EA)</p> <p>Eficiencia de edición</p> <p>eventos "off-target" (EOT).</p> <p>Persistencia de las células T <i>in vivo</i></p> <p>Promedio de la vida media de las células T editadas (VM)</p> <p>Desenlaces clínicos</p>	<p>EA: no se observó toxicidades graves. No se reportó ningún caso de SLC**.</p> <p>Eficiencia de edición: óptima (correcta disrupción de los 3 loci genéticos y correcta función antígeno-específica)</p> <p>EOT: frecuencia baja para los tres genes editados.</p> <p>Persistencia in vivo: 3 a 9 meses post-infusión</p> <p>VM: 83.9 días.</p> <p>Desenlaces clínicos: estabilidad de la enfermedad en 2 pacientes. Regresión tumoral parcial en UPN39.</p>	<p>El estudio mostró la seguridad y viabilidad de la terapia con células T editadas mediante CRISPR. No obstante, se necesitan más estudios y un mayor tamaño muestral tanto para confirmar la seguridad como para determinar la eficacia antitumoral.</p>	<p>MODERADO: Es un estudio en fase I, abierto y no aleatorizado. No hay grupo control comparativo por lo que no puede determinarse la eficacia del tratamiento.</p>

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS ESTUDIOS REVISADOS

Artículo 1: Lu Y., Xue J., Deng T., Zhou X., Yu K., *et al.* Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nat Med.*2020; 26.

Este artículo, publicado en mayo del 2020 por la Revista *Nature* (83), corresponde a un ensayo clínico de escalada de dosis en fase I, abierto y no aleatorizado. El estudio fue elaborado en China, iniciándose el 26 de agosto del 2016 y finalizando el 21 de marzo del 2018. El seguimiento de los pacientes implicados se prolongó hasta el 31 de enero del 2020.

El principal objetivo de este ensayo clínico era comprobar la seguridad y viabilidad de la terapia con células T editadas genéticamente mediante CRISPR-Cas9 en pacientes con cáncer refractario. Concretamente, la edición de las células T consistía en hacer una disrupción del “checkpoint” inhibitorio PD-1. Por otro lado, se establecieron otros objetivos secundarios enfocados a la eficacia y la optimización de dicha terapia.

Para lograr estos fines, se escogió una muestra inicial de 22 pacientes que quedó reducida a 12, tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión instaurados (**Fig.9**). Es importante señalar que uno de los 12 sujetos de la muestra abandonó el estudio, siendo los resultados analizados en una muestra final de 11 pacientes.

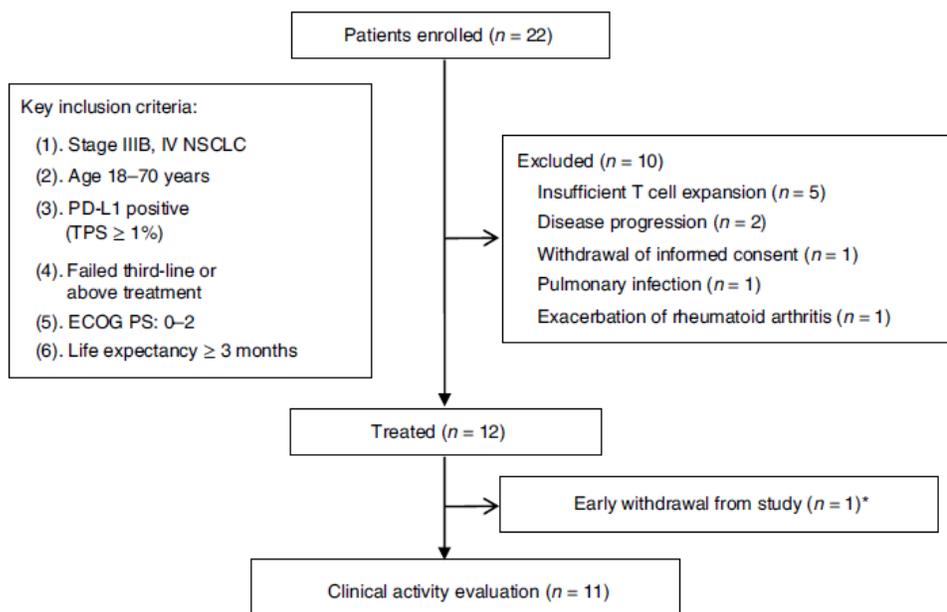


Fig.9. Diagrama CONSORT mostrando los diferentes estadios de selección de los sujetos de la muestra del ensayo clínico en fase I (TPS: “tumor proportion score”) (Lu *et al.*, 2020).

A continuación, comentaremos los aspectos más importantes del estudio mediante distintos apartados:

❖ Pacientes, intervención y dosis administradas:

Una vez seleccionados los pacientes, estos fueron divididos en 4 cohortes: Pre-A(n=2), A(n=4), B(n=3) y C(n=3) (**Anexo tabla 2**). La primera cohorte, pre-A, compuesta por dos pacientes, recibió en primer lugar el tratamiento. Cada uno de ellos recibió una dosis de 2×10^7 células T editadas/kg.

A continuación, ambos fueron monitorizados durante 28 días y, una vez comprobada la ausencia de toxicidades significativas, se procedió a tratar a las cohortes restantes (A, B y C) con la misma terapia a dosis crecientes (en escalada).

La terapia administrada se dividió en diferentes ciclos. En el primer ciclo, las cohortes A, B y C, recibieron dosis de 1×10^7 céls/kg, 2×10^7 céls/kg y 4×10^7 céls/kg. Dichas dosis se administraron en series de tres infusiones los días 1, 3 y 5, de forma escalonada. La primera infusión contenía el 20% del número de células, la segunda el 30% y finalmente, la tercera el 50%. Cabe apuntar que tres días antes de la primera infusión, los pacientes recibieron una dosis de 20mg/kg de ciclofosfamida para lograr una depleción linfocitaria. No se especifica si alguno de los pacientes recibió algún tratamiento concomitante.

A continuación, tras 28 días desde la primera infusión, en ausencia de toxicidades y progresión de la enfermedad, se decidió administrar un segundo ciclo, esta vez sin la dosis previa de ciclofosfamida. De este modo, si los pacientes obtenían beneficio clínico, se administrarían ciclos sucesivos hasta la aparición de efectos adversos inaceptables (tales como síndrome de liberación de citocinas u otros efectos adversos de grado ≥ 2), rechazo del consentimiento por parte del paciente o progresión de la enfermedad (**Fig. 10**).

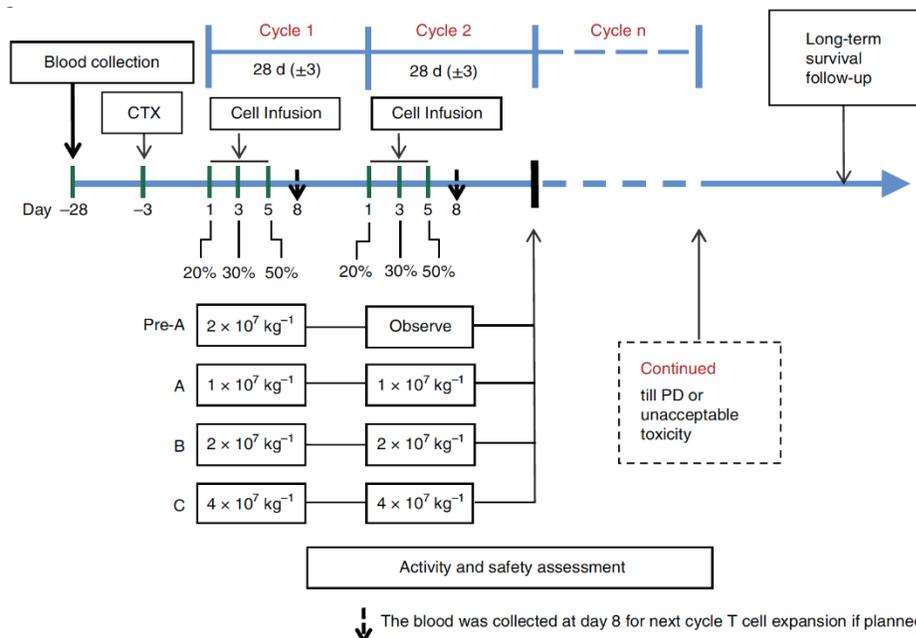


Fig.10. Diagrama que resume el proceso de administración de la terapia con células T a los pacientes implicados en el estudio (PD: “progressive disease”, CTX: cyclophosphamide”) (Lu *et al.*, 2020).

❖ Variables medidas, métodos empleados y resultados obtenidos

1) Viabilidad *ex vivo* de las células T editadas

Las células mononucleares se aislaron de la sangre periférica de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, antes de cada ciclo. Por otro lado, se aplicó el sistema CRISPR-Cas9, mediante el diseño de un par de sgRNA complementarios al exón del gen PD-1. Los plásmidos de sgRNA y Cas9 fueron transferidos a las células mediante electroporación.

En total se consiguieron células T de alta viabilidad (>90%) en 17 de los 22 pacientes de la muestra inicial, con una tasa de éxito del 77,3%. No obstante, la infusión se realizó únicamente en 12 pacientes.

Por otra parte, a lo largo del curso del estudio se observó una mayor capacidad de estabilidad y expansión de las células T editadas en los pacientes B-01 y C-02, con respecto a las no editadas (Fig.11).

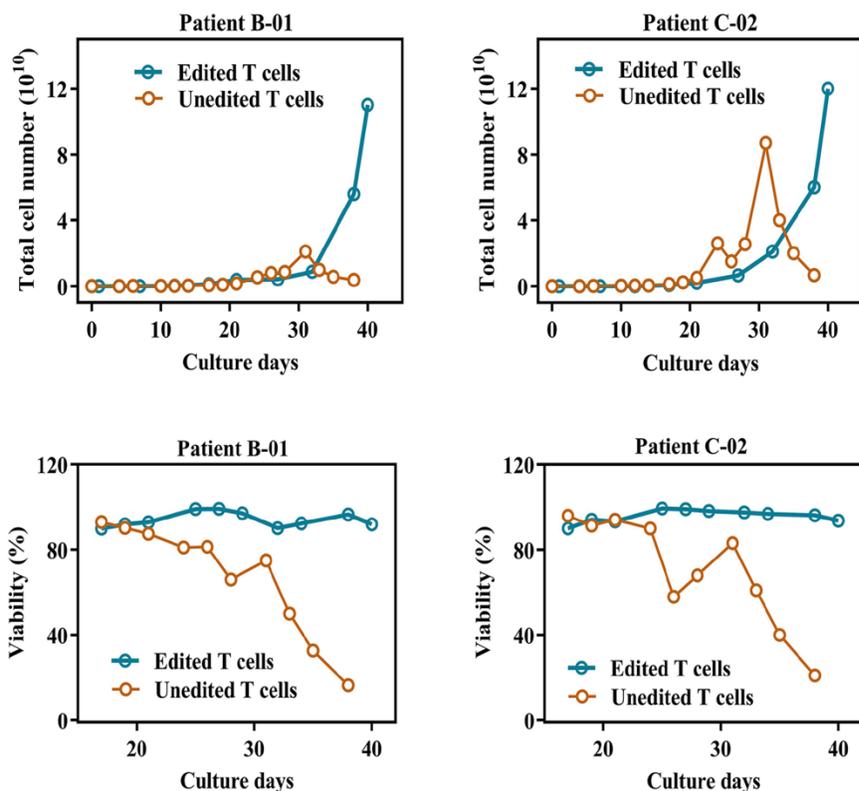


Fig. 11. Efectos a largo plazo de las células T con disrupción de PD-1 cultivadas en los pacientes B-01 y C-02. Las células T no editadas empezaron a decrecer rápidamente a partir del día 30 mientras que la viabilidad de las células T editadas se mantuvo por encima del 90% hasta el día 40. En los dos gráficos superiores observamos cómo la proliferación de las células T editadas fue algo más lenta que la de las células no editadas. No obstante, a partir del día 30, el número de células T editadas creció rápidamente (Lu *et al.*, 2020).

2) Evaluación de la eficiencia de edición de las células T

Con el fin de evaluar si la edición de las células T había sido óptima, se emplearon distintas técnicas de secuenciación. Por un lado, la herramienta T7E1 surveyor (Anexo Fig.2.a) permitió cuantificar, en un primer momento, las tasas de mutación.

Con el fin de afianzar los resultados obtenidos, se recurrió a una segunda técnica de citometría de flujo que permitió detectar la expresión de PD-1, comprobando así la disrupción genética (**Anexo fig.2.b**). En tercer lugar, se empleó un método de secuenciación tradicional (“TA-Cloning”) (**Anexo fig.2.c**). Por último, para una mayor validación de la edición genética, se utilizó la tecnología de secuenciación de nueva generación o NGS (del inglés “Next Generation Sequencing”) (**Anexo fig.2.d**).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Método T7E1: eficiencia mediana de edición genética del 20.1%.
- Citometría de flujo: mediana de disrupción genética de PD-1 del 46.3%. Se observó una expresión significativamente disminuida del gen PD-1 en las células editadas, con respecto a las no editadas.
- “TA-cloning”: mediana de la eficiencia de edición genética de PD-1 del 16%.
- NGS: mediana de la eficiencia de edición genética de los 12 pacientes de 5.81%.

3)Detección de eventos off-target

Se emplearon dos métodos de secuenciación para detectar las mutaciones off-target de las células T editadas. Recordemos que esta es una de las principales limitaciones de la herramienta CRISPR-Cas.

A través del método NGS, se observó una mediana de la frecuencia de mutaciones off-target del 0.05, mucho más baja en comparación con la frecuencia de mutaciones on-target, que fue del 1,69%.

En segundo lugar, para una detección más exhaustiva, se empleó el método WGS (“Whole Genome Sequencing”) y no se detectaron eventos off-target. Sin embargo, es preciso destacar que el hecho de no haber detectado ningún evento off-target a través del método WGS no excluye definitivamente que estos no estén realmente presentes.

4)Eventos adversos

Para evaluar la seguridad de la terapia administrada, los eventos adversos observados se clasificaron en diferentes grados en función de su gravedad: 1 (leve), 2(moderado) y ≥ 3 (grave). Todo evento ≥ 3 sería considerado como inaceptable.

En un primer momento, se evaluó la seguridad en los pacientes de la cohorte pre-A. El paciente pre-A-01 sufrió, tras la primera infusión, una arritmia de grado 1 (extrasístoles). Sin embargo, no volvió a presentar ningún evento adverso con las infusiones siguientes en los días 3 y 5. Por otro lado, el paciente pre-A-02 no sufrió ningún evento adverso.

A continuación, los 10 sujetos implicados en las cohortes A, B y C recibieron un total de 37 infusiones hasta la fecha de finalización.

Se observó la aparición de eventos adversos grado 1-2 en 11 de los 12 pacientes, siendo el paciente C-03 el único que no sufrió ningún tipo de evento adverso. No obstante, eventos con un grado igual o mayor a 3 no fueron reportados (Tabla 2).

Cabe mencionar que los efectos adversos que mayor duración tuvieron fueron la artralgia, las extrasístoles y la fatiga, estando presentes durante 52,4 semanas, 19.1 semanas y 15.1 semanas respectivamente.

Por otro lado, es importante señalar que ninguno de los pacientes sufrió un síndrome de liberación de citocinas, siendo este uno de los eventos más temidos a la hora de administrar las terapias con células T.

Tabla 2. Resumen de los principales eventos adversos asociados al tratamiento con células T editadas mediante CRISPR-Cas9. (Modificado de Lu et al, 2020).

AE ^a grade (%)	Total				Cohort											
	(n=12)				Pre-A (n=2)			A (n=4)			B (n=3)			C (n=3)		
	Total	1	2	≥3	1	2	≥3	1	2	≥3	1	2	≥3	1	2	≥3
Any event	11 (92)	8 (67)	3 (25)	0	2 (100)	0	0	3 (75)	1 (25)	0	2 (67)	1 (33)	0	1 (33)	1 (33)	0
Lymphopenia	3 (25)	2 (17)	1 (8)	0	1 (50)	0	0	0	0	0	1 (33)	0	0	0	1 (33)	0
Fatigue	3 (25)	3 (25)	0	0	1 (50)	0	0	0	0	0	2 (67)	0	0	0	0	0
Leukopenia	2 (17)	1 (8)	1 (8)	0	0	0	0	1 (25)	0	0	0	1 (33)	0	0	0	0
Fever	2 (17)	2 (17)	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (67)	0	0	0	0	0
Arthralgia	2 (17)	2 (17)	0	0	0	0	0	1 (25)	0	0	1 (33)	0	0	0	0	0
Rash	2 (17)	2 (17)	0	0	1 (50)	0	0	1 (25)	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutropenia	1 (8)	0	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	1 (33)	0	0	0	0	0
Infusion-related reaction	1 (8)	0	1 (8)	0	0	0	0	1 (25)	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperhidrosis	1 (8)	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (33)	0	0	0	0	0
Premature beats ^b	1 (8)	1 (8)	0	0	1 (50)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypertension	1 (8)	1 (8)	0	0	1 (50)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Increased AST	1 (8)	1 (8)	0	0	0	0	0	1 (25)	0	0	0	0	0	0	0	0
Increased ALT	1 (8)	1 (8)	0	0	1 (50)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thrombocytopenia	1 (8)	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (33)	0	0	0	0	0
Anemia	1 (8)	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (33)	0	0

5)Desenlaces clínicos

Para sintetizar las variables de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global, se utilizó el método de Kaplan-Meier (**Fig.12**). La primera variable se define como el tiempo transcurrido entre la primera infusión hasta la fecha de progresión de enfermedad o muerte por cualquier causa. La segunda corresponde al tiempo transcurrido entre la fecha de la primera infusión hasta la fecha de muerte por cualquier causa.

De este modo, para los 12 pacientes del estudio, la mediana obtenida para la variable de supervivencia libre de enfermedad fue de 7,7 semanas (IC 95%: 6,9-8,5 semanas).

Por otro lado, la mediana de supervivencia global fue de 42,1 semanas (IC 95%: 13,4-116 semanas). En uno de los doce pacientes no pudo analizarse la eficacia de tratamiento debido a su retirada precoz del estudio.

Por último, la tasa de control de enfermedad durante 8 semanas (variable que midió el porcentaje de pacientes con enfermedad estable desde el inicio del tratamiento hasta 8 semanas después) fue del 16,7% (2/12 pacientes; IC 95%: 2,1-48,4%). Es decir, dos pacientes de la muestra, pre A-01 y B-01, tuvieron una enfermedad estable durante el estudio. Sin embargo, ninguno de los pacientes mostró respuesta parcial al tratamiento.

Una vez finalizado el estudio se hizo un seguimiento posterior de los pacientes, observándose (enero del 2020) una progresión de la enfermedad en todos ellos.

De esta forma, 11 de los 12 pacientes acabaron falleciendo debido a la progresión del tumor. Ninguna de las muertes acontecidas se asoció al tratamiento administrado en este estudio.

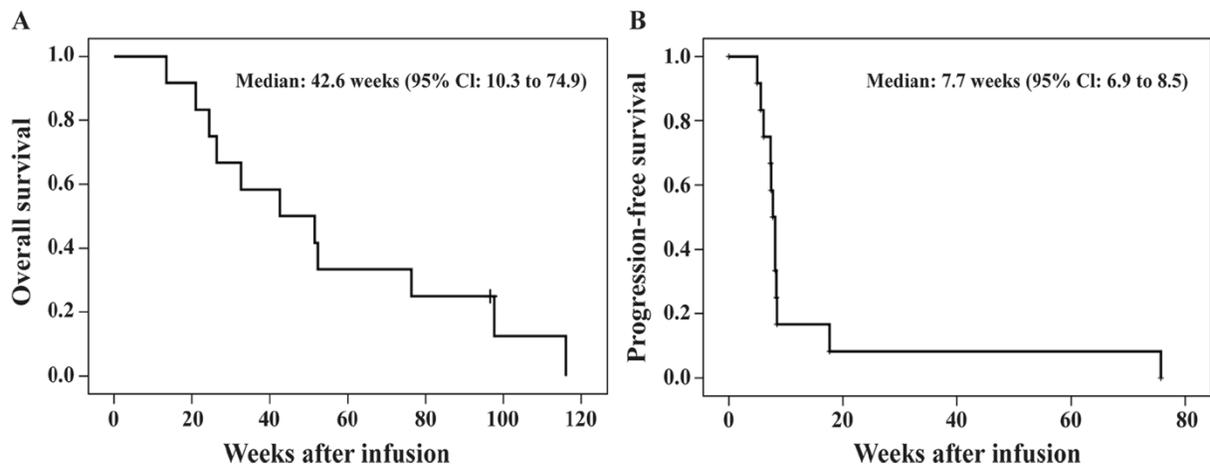


Fig.12. Estimación de la supervivencia de los pacientes mediante el método de Kaplan-Meier. A. Supervivencia global. B. Supervivencia libre de enfermedad (Lu et al, 2020).

6) Persistencia in vivo de las células T editadas

Para evaluar la persistencia in vivo de las células T editadas, de nuevo se utilizó el método NGS. Se observó una correcta disrupción del gen PD-1 en 11 de los 12 pacientes durante 8 a 52 semanas, dependiendo del paciente. Es importante comentar que uno de los pacientes que tuvo un control duradero de su enfermedad (B-01) mostró también una persistencia con niveles moderados de gen PD-1 editado (Fig.13.a).

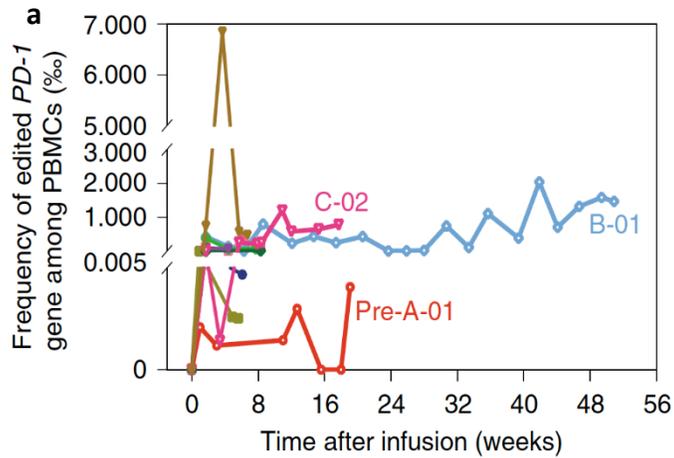


Fig. 13.a. Frecuencia del gen PD-1 editado en las células de la sangre periférica de cada paciente, determinada mediante NGS. Obsérvese cómo los niveles del gen PD-1 editado en las células T del paciente B-01 fueron moderados y persistentes a lo largo del tiempo (modificado de Lu *et al.*, 2020).

7) Diversidad clonal de los TCR periféricos

La diversidad en el receptor T de los linfocitos se relaciona con una mejor respuesta a la inhibición del “checkpoint” correspondiente, es decir, representa una correcta modulación del sistema inmunitario tras la inhibición, en este caso, de PD-1.

A lo largo del estudio, se observó una diversidad del TCR en todos los sujetos del estudio. De este modo, el índice medio de diversidad del TCR, calculado mediante el índice de Shannon, fue de 6.54 en la semana 8, 7.05 en la semana 20 y 8.33 en la semana 68 tras la terapia. El paciente B-01 mostró una tendencia persistente de esta diversidad del TCR a lo largo del tiempo (**Fig. 13.b**).

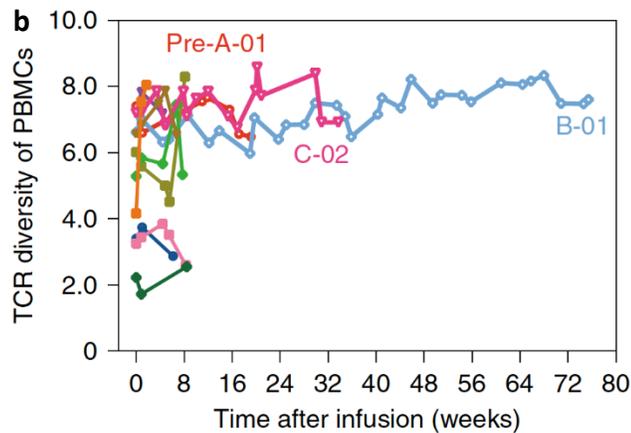


Fig. 13.b. Diversidad de los TCR en la sangre periférica de los pacientes en diferentes puntos del estudio. Obsérvese cómo la diversidad de los TCR en el paciente B-01 es elevada y persistente a lo largo del tiempo (modificado de Lu *et al.*, 2020).

8)Desenlace clínico del paciente B-01

Los resultados obtenidos en esta paciente fueron prometedores, ya que su enfermedad se estabilizó durante 76 semanas en el curso del ensayo clínico. De este modo, en la semana 52 tras la primera infusión, sólo se observó una región del tumor con actividad metabólica aumentada en el PET-TC. Por otro lado, una biopsia realizada en la semana 54 mostró un residuo tumoral mínimo, así como una infiltración significativa de células T(CD3+/CD8+) y macrófagos activados (CD68+). No obstante, cuando se realizó la biopsia en la semana 76, es decir, en el momento en el que el tumor progresó, la infiltración de células T era mínima.

Cabe destacar que los niveles de células T editadas en este sujeto fueron moderados y más persistentes que en otros pacientes, lo que probablemente tuviera relación con un control de la enfermedad durante más tiempo.

Artículo 2: Stadmauer E.A., Fraietta J.A., Davis M.M., Cohen A.D., Weber K.L., Lancaster E., et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020; 367. (registrado en ClinicalTrials.gov NCT03399448).

Este artículo es un ensayo clínico en fase I, abierto y no aleatorizado, realizado en Estados Unidos y publicado en la revista *Science* el 6 de febrero del 2020 (84).

Al igual que en el estudio de Lu *et al*, la finalidad principal de este estudio fue comprobar la seguridad y viabilidad de la terapia administrada. No obstante, en este caso no se establecieron, claramente, objetivos secundarios relacionados con la eficacia.

Para lograr sus objetivos, los investigadores seleccionaron una muestra inicial de seis pacientes. No obstante, solo en cuatro de ellos se logró una edición de células T adecuada. Finalmente, dado que uno de estos cuatro pacientes tuvo una progresión de su enfermedad, quedó una muestra final de n=3.

Dos de estos pacientes, UPN35 y UPN07, tenían un mieloma múltiple en fase avanzada, mientras que el tercero, UPN39, tenía un sarcoma metastásico. Todos estos tumores eran refractarios a tratamientos previos.

A continuación, especificaremos los datos más relevantes del estudio:

❖ **Pacientes, intervención y dosis administradas:**

En este ensayo clínico se decidió realizar la inmunoterapia a través de células con TCR modificado, en lugar de con células CART, ya que se han reportado más toxicidades asociadas a este último receptor.

De acuerdo con lo que relatan los autores del ensayo clínico, los TCR modificados han mostrado en estudios anteriores reacciones de autoinmunidad al competir las cadenas α y β del TCR sintético con las cadenas del TCR endógeno. Para evitar esto y hacer la inmunoterapia más segura, se realizó a través de CRISPR un “knockout” de los genes TRAC y TRBC asociados al TCR α y TCR β endógenos, respectivamente. Por otro lado, al igual que en el estudio de Lu *et al*, se realizó una disrupción del gen PDCD1 (PD-1).

Por otro lado, se modificó el receptor TCR para que se dirigiera específicamente contra el antígeno NY-ESO-1, que ha sido identificado en distintos tipos tumorales. Este antígeno ha mostrado una gran capacidad para inducir inmunidad humoral y celular, por lo que es una buena diana para combatir el cáncer.

En definitiva, se elaboraron células T autólogas genéticamente modificadas para reconocer el antígeno NY-ESO-1 y generar una disrupción en 3 loci diferentes: TRAC, TRBC y PDCD1.

Una vez editadas, las células T se inocularon a la muestra mediante una única infusión a dosis de 1×10^8 células/kg. Tras ello se realizó un seguimiento de los pacientes, primero cada 3-4 días y posteriormente cada 3 meses. El seguimiento total fue de 2 años. Los pacientes recibieron quimioterapia linfodepletora para promover la expansión de las células T inoculadas.

❖ **Variables medidas, métodos empleados y resultados obtenidos**

1) **Persistencia *in vivo* de las células T editadas**

A través de técnicas de citometría de flujo, se determinó una frecuencia de edición del 45% para el gen TRAC, 15% para el TRBC y 20% para el PDCD1. Además, las células editadas mostraron una potente citotoxicidad antígeno-específica contra NY-ESO-1.

Una vez los pacientes fueron infundidos con 1×10^8 células/kg, se monitorizó la persistencia *in vivo* de las células T editadas. Dicha persistencia fue considerable prolongándose de 3 a 9 meses tras la infusión.

De este modo, la vida media promedio de las células editadas fue de 83.9 días (Fig.14a), lo que, de acuerdo con los autores, supera los resultados obtenidos en estudios previos, siendo la vida media reportada de aproximadamente 1 semana (85).

Curiosamente, la frecuencia detectada de las células con TRBC editado, fue menor que la de los genes TRAC y PDCD1. Esto concuerda con que la eficiencia de edición de este gen fuera más baja con respecto a los otros dos genes (15%). (Fig. 14b.)

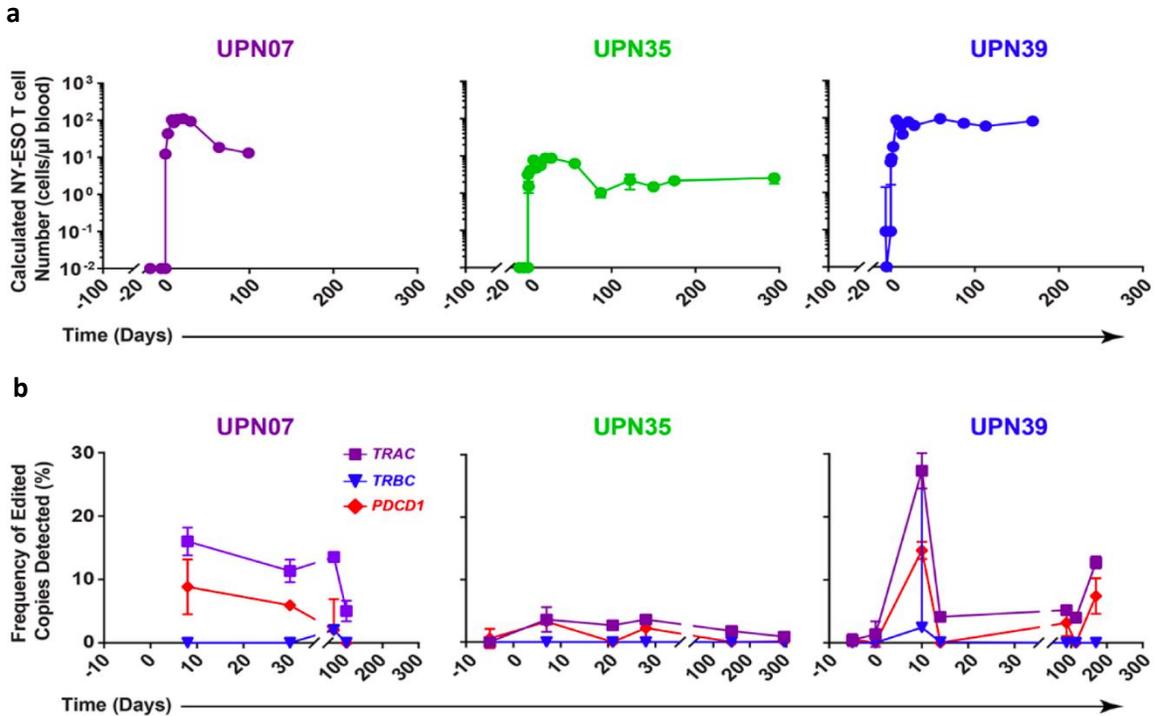


Fig.14. a) número absoluto de células editadas por microlitro de sangre desde el día de la infusión hasta varios días post-infusión. **b)** frecuencia de células T editadas (TRAC, TRBC y PDCD1) antes y después de la administración de la terapia (modificado de Stadtmayer *et al.*, 2020).

2) Seguridad: Efectos adversos

Ninguno de los eventos adversos observados fue de gravedad (**Anexo tabla.3**). Además, no hubo casos de síndrome de liberación de citocinas. Por último, los autores concluyen que la mayoría de estas toxicidades se asociaron a la quimioterapia linfodepletora y no a la inmunoterapia *per se*.

3) Eventos off-target

La herramienta de secuenciación iGUIDE se utilizó para determinar la especificidad de edición genética. La distribución de eventos on-target y off-target se midió para cada uno de los tres sgRNA usados en el estudio. De este modo, se observó que la frecuencia de eventos off-target en el gen TRBC fue mayor que en los otros dos loci.

Por otro lado, la frecuencia de off-target para el gen PDCD1 fue mínima, siendo esta edición genética la de mayor especificidad. Por último, en los genes TRAC, la frecuencia de off-target detectada fue también muy baja. Por lo contrario, la mayoría de las mutaciones detectadas fue de tipo on-target (**Anexo fig.3**).

4)Desenlaces clínicos

La mejor respuesta clínica obtenida fue la estabilidad de la enfermedad en dos de los pacientes. Además, el paciente UPN39 mostró una reducción del 50% en el tamaño de una masa tumoral abdominal. Este paciente fue por tanto quien mostró un mejor efecto citotóxico de la terapia administrada. No obstante, otras de sus lesiones progresaron durante el estudio, por lo que la respuesta no fue del todo satisfactoria.

Cabe destacar por otro lado que, en los pacientes con mieloma la biopsia de los residuos tumorales mostró una reducción del antígeno específico NY-ESO-1, lo que sugiere que las células T fueron correctamente editadas para dirigirse contra esta proteína diana.

En diciembre del 2019, todos los pacientes tuvieron una progresión de su enfermedad. De hecho, UPN07, murió a causa del desarrollo de su mieloma.

5)Paciente UPN39

El paciente UPN39 fue quien mostró mejores resultados clínicos. Sus células T fueron recolectadas los días 10 y 113 post-infusión y, posteriormente, analizadas *ex vivo*. Se observó que el 30% de estas tenían una edición de dos o tres loci genéticos. Por otro lado, el 40% tenían una única mutación. Por tanto, la edición genética celular se mantuvo estable a lo largo del tiempo.

Por otro lado, se observó como las células de este paciente, mostraron un incremento en la expresión de genes relacionados con la memoria inmunitaria. Estos resultados contrastan con los de estudios previos. donde las células T no editadas no generaban memoria. Por tanto, estas diferencias pueden asociarse a la optimización de las células T editadas mediante CRISPR, que permitiría prevenir el fenómeno de “agotamiento” de las células T usadas en inmunoterapia.

TABLA COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS MÁS RELEVANTES DE LOS ESTUDIOS REVISADOS

Con el fin de sintetizar los resultados de ambos estudios, se ha elaborado una tabla comparativa con los datos más relevantes para abordar nuestra pregunta de investigación (**Tabla 3**).

Tabla 3. Comparación de las medidas de resultados de cada estudio.

Ensayo clínico	Eventos adversos	Eficiencia de edición	eventos off-target	Persistencia in vivo	Desenlaces clínicos de interés	¿Es la terapia segura y viable?	¿Es la terapia eficaz?
Lu et al.	Leves o moderados (grado < 3)	Óptima (correcta disrupción de PD-1)	Frecuencia de eventos off-target baja (0.05)	8-52 semanas	2/12 pacientes mostraron enfermedad estable durante 8 semanas. En uno de ellos, el control de la enfermedad se alargó hasta 76 semanas.	SI	Los resultados no permiten confirmarlo de momento. Para poder determinar la eficacia, se necesitaría un grupo control.
Stadtmauer et al.	Leves o moderados (la mayoría asociados a la quimioterapia linfodepletora)	Óptima (correcta disrupción de TRAC, TRBC y PDCD1.	Se detectan pocos eventos off-target para cada uno de los genes modificados (frecuencia no especificada)	3 -9 meses (≈13-39 semanas)	2/3 pacientes mostraron enfermedad estable (duración no especificada). Uno de ellos tuvo además una regresión del 50% en una masa tumoral abdominal (aunque otras lesiones progresaron).	SI	Los resultados no permiten confirmarlo de momento. Para poder determinar la eficacia, se necesitaría un grupo control.

EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGO

Siguiendo las recomendaciones del capítulo 8.5 del manual Cochrane versión 5.1.0 hemos elaborado una tabla (**Tabla 4.**) que resume los diferentes riesgos de sesgo de cada estudio revisado. El proceso detallado de la evaluación del riesgo de sesgo se expone en el anexo (**Anexo tabla 4. a y 4b**).

Tabla 4. Evaluación del riesgo de sesgo de los estudios revisados.

	Generación de la secuencia (sesgo de selección)	Ocultamiento de la asignación (sesgo de selección)	Cegamiento de los participantes (sesgo de realización)	Cegamiento del personal del estudio (sesgo de realización)	Cegamiento de los evaluadores (sesgo de desgaste)	Datos de resultado incompletos (sesgo de desgaste)	Notificación selectiva de los resultados (sesgo de notificación)	Riesgo final
Lu et al., 2020	Alto riesgo	Alto riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Riesgo poco claro	Bajo riesgo	Bajo riesgo	MODERADO
Stadtmauer et al., 2020	Alto riesgo	Alto riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Riesgo poco claro	Bajo riesgo	Riesgo poco claro	MODERADO

DISCUSIÓN

Con el fin de sintetizar los hallazgos de los artículos revisados en nuestro trabajo y, finalmente, extraer conclusiones, es preciso recordar nuestra pregunta de investigación: **¿Es la aplicación de CRISPR una opción segura y eficaz para mejorar la inmunoterapia en pacientes con cáncer?**

Por un lado, la seguridad de la terapia con células T editadas mediante CRISPR-Cas se ha demostrado en ambos artículos. De esta forma, la baja detección de eventos-off target en cada uno de los ensayos clínicos, solventa una de las principales limitaciones de la tecnología CRISPR. Además, no se reportó ningún caso de síndrome de liberación de citocinas, una de las toxicidades más severas y letales asociadas a la inmunoterapia.

Por otra parte, la persistencia *in vivo* a largo plazo de las células editadas, demostró una clara viabilidad de esta terapia. Cabe señalar que en el estudio de Stadtmayer *et al.*, las células editadas de uno de los pacientes mostraron una expresión aumentada de algunos genes relacionados con la memoria inmunitaria, lo que contrasta con resultados de estudios previos donde los niveles de células T usadas en inmunoterapia decaían a lo largo del tiempo, fenómeno conocido como “T cells exhaustion” (“Agotamiento de células T”).

El hecho de que la edición genómica de células T mediante CRISPR-Cas haya resultado ser segura y factible en los dos ensayos clínicos, avala la investigación en esta línea hacia el destino deseado: la cura contra el cáncer.

No obstante, con lo que respecta a la eficacia antitumoral de la terapia, los resultados no son concluyentes en ninguno de los dos estudios. Si bien se demostró una estabilidad de la enfermedad en algunos de los pacientes e incluso, una reducción de la masa tumoral en uno de ellos, la respuesta al tratamiento no fue significativa. Al acabar el estudio, todos los pacientes mostraron una progresión de su enfermedad. Además, es preciso señalar que para comprobar la eficacia de una intervención, debe llevarse a cabo un estudio experimental donde el grupo tratado sea comparado con un grupo control. Esta es, por tanto, una de las principales limitaciones de los estudios revisados.

Por otro lado, en cuanto a las limitaciones de nuestra revisión sistemática, cabe señalar que el reducido número de ensayos clínicos disponibles hasta la fecha, hace que la evidencia sea todavía escasa.

En consecuencia, se necesitarán futuros ensayos clínicos que permitan determinar la eficacia de este innovador tratamiento y extrapolar los resultados a la población.

Una vez expuestos y analizados los resultados de estos estudios, es preciso plantearse otras cuestiones tales como ¿hasta dónde podemos llegar con CRISPR?

Los ensayos clínicos más recientes se han aproximado, a nuevas terapias oncológicas contra el cáncer (84,85), a la posible cura de enfermedades hematológicas hereditarias (32) e incluso, se ha expuesto un primer acercamiento a una cura potencial contra el VIH mediante la modificación del gen CCR5 (86). Todo ello plantea la posibilidad de curar enfermedades genéticas mediante la modificación de un fragmento de nuestro genoma. Esto englobaría desde las enfermedades más raras hasta las más prevalentes, como la diabetes.

Si todo ello se hiciera realidad, los límites del alcance de la medicina serían cada vez menores y, por consiguiente, habría que plantearse nuevos retos para una población con una esperanza de vida cada vez mayor y, por lo tanto, más envejecida.

Además, no podemos obviar el aspecto bioético de la tecnología CRISPR. Esto nos incita a formular la siguiente pregunta: ¿Podemos aplicar CRISPR en células germinales?

Antes de que se haya podido responder a esta cuestión, investigadores chinos ya demostraron que es posible. En 2015, publicaron un ensayo clínico en el cual modificaban el gen de la globina en embriones humanos. Esto generó una gran controversia y abrió el debate acerca de los límites éticos de la edición del genoma.

Así, si bien la posibilidad de evitar enfermedades incapacitantes o incluso letales en futuros individuos, puede resultar más que lícito, el hecho de abrir la posibilidad a mejorar aspectos físicos, emocionales o intelectuales generando entes cada vez más “perfectos” o adaptados a la sociedad actual, recuerda más bien a la distopía de Huxley.

CONCLUSIONES

Para concluir nuestra revisión sistemática, podemos decir que hemos logrado abordar el principal objetivo planteado en nuestra revisión: evaluar la toxicidad y viabilidad de la edición genómica de linfocitos T para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la eficacia del tratamiento no ha podido ser evaluada puesto que los artículos no han llegado a fase II con grupos aleatorizados. A pesar de ello, la combinación de estas dos modalidades, terapia génica e inmunoterapia, aparece como una posible cura contra el cáncer. La optimización rápida y efectiva de las células T con CRISPR, supone un avance en diseño y abaratamiento de costes respecto a otras tecnologías de edición genética previas, tales como ZNF o TALEN. Además, la menor ocurrencia de eventos adversos asociados a la inmunoterapia, comparado con los tratamientos convencionales más agresivos, mejoraría la calidad de vida de los pacientes oncológicos.

Por último, el aumento de la citotoxicidad contra el tumor podría alargar la supervivencia de los enfermos. Sin embargo, insistimos en que todavía se necesitan más datos para poder llegar hasta este punto.

“Medical science has made such tremendous progress that there is hardly a healthy human left”-Aldous Huxley-

BIBLIOGRAFÍA

1. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR Cas: Backward and Forward. *Cell Press*. 2018; 172(6): 1239–1259.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *J Bacteriol*. 1987; 169 (12): 5429–5433.
3. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol*. 2005; 60(2): 174-182.
4. Makarova KS, Grishin N V, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. 2006;1 (7): 1-26.
5. Hermans PWM, Van Soolingen D, Bik EM, De Haas, PEW, Dale JW, Van Embden JDA. Insertion Element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG Is Located in a Hot-Spot Integration Region for Insertion Elements in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Infect Immun*. 1991; 59(8): 2695-2705.
6. Mojica, F.J.M., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F., Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*. 1993; 9(3): 613-621.
7. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol*. 2018; 200(7): 1-17.
8. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2007; 315(5819):1709–1712.
9. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012; 337(6096):816-821
10. Rossiter MW. The Matthew Matilda Effect in Science. *Social Studies of Science*. 1993; 23(2): 325-341.
11. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(39):2579-2586.
12. Giorgia Guglielmi. Kavli prize recognizes scooped biochemist Virginijus Siksnys shares award for CRISPR contributions. *Nature*. 2018; 558.

13. Cong L, Ran F.A, Cox D., Lin S., Baretto R., Habib N., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339(6121): 819-823.
14. Mali P., Yang L., Esvelt KM., Aach J., Guell M., DiCarlo JE., et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339 (6121): 823–826.
15. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020; 5 (1) :1-23.
16. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Horvath P, Moineau S, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467–477.
17. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnsbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13: 722-736
18. Makarova K.S., Wolf. Y.I. and Koonin E.V. The basic blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochemical Society Transactions*. 2013; 41 (6): 1392-1400
19. Marraffini L.A. and Sontheimer E.J. Self versus non-self-discrimination during CRISPR-RNA-directed immunity. *Nature*. 2010; 463 (7280): 568-571.
20. Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C. García-Martínez J. and Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009; 155: 733-740.
21. Knott J. and Doudna J., CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*. 2018; 361 (6405): 866-869.
22. Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG. Nonhomologous DNA End Joining (NHEJ) and Chromosomal Translocations in Humans. *Subcell Biochem*. 2010; 50: 279–296.
23. Pawelczak K.S., Gavande N.S., VanderVere-Carozza P.S. and Turchi. J.J. Modulating DNA repair pathways to improve precision genome engineering. *ACS Chemical Biology*. 2018;13(2): 389-396.
24. Shin JJ, Schröder MS, Caiado F, Wyman SK, Bray NL, Bordi M, et al. Controlled Cycling and Quiescence Enables Efficient HDR in Engraftment-Enriched Adult Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Reports*. 2020; 32 (9): 1-20.
25. Ding Q., Strong A., Patel K.M., Ng S.L., Gosis B.S., Regan S.N., et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*. 2014;115 (5): 488-492.
26. Wasala N.B., Nelson C.E., Wasala L.P., Yue Y., Louderman J.A., Lessa T.B., et al. AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice. *JCL insight*. 2018; 3(23):1-13.
27. Zhang Y, Long C, Li H, Mcanally JR, Baskin KK, Shelton JM, et al. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice. *ScienceAdvances*. 2017; 3(4):1-10.
28. Long C, Li H, Tiburcy M, Rodriguez-Caycedo C, Kyrychenko V, Zhou H, et al. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *ScienceAdvances*. 2018;4 (1): 1-11.
29. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration generated minicircle DNA vectors performed single-cell genotyping. *Nature*. 2016;540 (7631): 144–149.
30. Hyun Jo D, Woo Song D, Sik Cho C, Gi Kim U, Jun Lee K, Lee K, et al. CRISPR-Cas9-mediated therapeutic editing of Rpe65 ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Science Advances*. 2019;5 (10): 1-9.

31. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine*. 2019; 25:229-233.
32. Frangoul H., Altschuler D., Capellini M.D., Chen Y.S., Domm J., Eustace B.K., et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2021; 384 (3): 252-260.
33. Xu S, Zhan M, Jiang C, He M, Yang L, Shen H, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies ELP5 as a determinant of gemcitabine sensitivity in gallbladder cancer. *Nature Communications*. 2019; 10(1): 1-14.
34. Lian Y-F, Yuan J, Cui Q, Feng Q-S, Xu M, Bei J-X, et al. Upregulation of KLHDC4 Predicts a Poor Prognosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma. *PLOS ONE*. 2016. 11(3):1-14.
35. Heckl D. , Kowalczyk S., Yudovich D. , Belizaire R, Puram R.V., McConkey M.E., et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32: 941-946.
36. Matano M., Date S., Shimokawa M., Takano A., Fujii M., Ohta Y., et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. 2015; 21: 256-262.
37. Fy Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., et al. High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013; 31(9): 822-826.
38. Manghwar H., Li B., Ding X., Hussain A., Lindsey K., Zhang X., et al. CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Advanced Science*. 2020;7: 1-16.
39. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M. and Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(3): 279–84.
40. Casini A, Olivieri M, Petris G, Montagna C, Reginato G, Maule G, et al. A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat Biotechnol*. 2018; 36(3): 265-271.
41. Zetche B, Volz SE, Zhang F, Biotechnol N. A Split Cas9 Architecture for Inducible Genome Editing and Transcription Modulation. *Nat Biotechnol* . 2015; 33(2): 139–142.
42. Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, Zuris JA, Liu DR. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol*. 2015; 11(5):316-318.
- 43 . Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*. 2014. 24(6):1012-1019.
44. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng* .2018; 2(6): 377-391.
45. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Cancer Therapy: Clinical Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinl Cancer Res*. 2011;17(3): 4550-4557.
46. Mollanoori H, Shahraki H, Rahmati Y, Teimourian S. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Hum Immunol*.2018;79(12): 876-882.
47. Harris DT, Kranz DM. Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trens Phramacol Sci*.2016; 37(3): 220-230.
48. Kalos M., Levine B.L., Porter D.L., Katz S., Grupp S.A., Bagg A., et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2011; 3(95):1-11.

49. Porter D.L., Levine B.L., Kalos M., Bagg A. and June C.H. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(8): 725-733.
50. Stephan A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 368 (16): 1509-1518.
51. Porter D.L., Hwang W., Frey N.V., Lacey S.F., Shaw P.A., Loren A.W., et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med.* 2015; 7(303): 1-11.
52. Schuster S.J., Svoboda J., Chong E.A., Nasta S.D., Mato A.R., Anak O., et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med.* 2017; 377(26): 2545-2554.
53. Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L., Lekakis L.J., Miklos D.B., Jacobson C.A., et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.*2017; 377(26): 2531-2544.
54. Seimetz D, Heller K and Richter J. Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Med.* 2019; 11:1-16.
55. Pang Y, Hou X, Yang C, Liu Y, Jiang G. Advances on chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for oncotherapy. *Molecular Cancer.*2018;17(91): 1-10.
56. Zhang C, Liu J, Zhong JF and Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res.* 2017; 5(22):1-6.
57. Yeku OO, Brentjens RJ, Soc B, Author T. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans.* 2016.; 44(2): 412–418.
58. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.*2018; 15(1): 47-62.
59. Gust J, Hay KA, Hanafi L-A, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, et al. Endothelial Activation and Blood–Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov.* 2017; 7(12): 1404-1419.
60. Hess C, Machado L, Irving M, Vuillefroy De Silly R, Scholten K, Dilek N, et al. engineering Chimeric Antigen Receptor T-Cells for Racing in Solid Tumors: Don't Forget the Fuel. *Front Immunol.* 2017; 8(267): 1-19.
61. Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang L-CS, Kapoor V, Predina J, et al. Expression of a Functional CCR2 Receptor Enhances Tumor Localization and Tumor Eradication by Retargeted Human T cells Expressing a Mesothelin-Specific Chimeric Antibody Receptor. *Clin Cancer Res.*2011; 17(4): 4719-4730.
62. Siddiqui I, Erreni M, Van Brakel M, Debets R, Allavena P. Enhanced recruitment of genetically modified CX3CR1-positive human T cells into Fractalkine/CX3CL1 expressing tumors: Importance of the chemokine gradient. *J Immunother Cancer.* 2016; 4(21): 1-12.
63. Pegram HJ, Purdon TJ, Van Leeuwen DG, Curran KJ, Giralt SA, Barker JN, et al. IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2015; 29(2): 415-422.
64. Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu M-F, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Ra2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(7): 571-581.
65. Wang L-CS, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. Targeting Fibroblast Activation Protein in Tumor Stroma with Chimeric Antigen Receptor T Cells Can Inhibit Tumor Growth and Augment Host Immunity without Severe Toxicity. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(2): 154-166.

66. Chong EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Ambrose DE, Gonzalez V, Levine BL, et al. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR. *Blood*. 2017; 129(8): 1039-1041.
67. Carbone D.P., Reck M., Paz-Ares L., Creelan B., Horn L., Steins M., et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017; 376(25): 2415–2426.
68. Postow M.A., Sidlow R. and Hellmann M.D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2018; 378(2): 158-168.
69. Salas-McKee J., Kong W., Gladney W.L., Jadowsky J.K., Plesa G., Davis M.M., et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the era of CAR T cell immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2019; 15(5): 1126-1132.
70. 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*. 2016; 23(9): 2255–2266.
71. Gornalusse G.G., Hirata R.K., Funk S., Rioloobos L. Lopes V.S., Manske G., et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol*. 2017;35(8): 765-722.
72. Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T., Van der Stegen S.J.C., Hamieh M., Cunanan K.M., et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 2017; 543 (7643): 113-117.
73. Zhang Y., Zhang X., Cheng C., Mu W., Liu X., Li N., et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med*. 2017; 11(4): 554-562.
74. Liu X., Zhang Y., Cheng C., Cheng A.W., Zhang X., Li N., et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res*. 2016; 27(1): 154-157.
75. Ren J., Liu X., Fang C., Jiang S., June C.H. and Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2016; 23(9): 2255-2266.
76. Rupp L.J., Schumann K., Roybal K.T., Gate R.E., Ye C.J., Lim W.A., et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep*. 2017; 7(737): 1-10.
77. Su S., Hu B., Shao J., Shen B., Du J., Du Y., et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep*. 2016; 6(20070): 1-13.
78. Hu B., Zou Y., Zhang L., Tang J., Niedermann G., First E., et al. Nucleofection with Plasmid DNA for CRISPR/Cas9-Mediated Inactivation of Programmed Cell Death Protein 1 in CD133-Specific CAR T Cells. *Hum Gene Ther*. 2019;30(4): 446-458.
79. Liao Y., Chen L., Feng Y., Shen J., Gao Y., Cote G., et al. Targeting programmed cell death ligand 1 by CRISPR/Cas9 in osteosarcoma cells. *Oncotarget*. 2017; 8(18): 30276-30287.
80. Hu W., Zi Z., Jin Y., Li G., Shao K., Cai Q., et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother*. 2018; 68(3): 365-377.
81. Ba y., Shi Y., Jiang W., Feng J, Cheng Y., Xiao L. et al., Current management of chemotherapy-induced neutropenia in adults: key points and new challenges. *Cancer Biol Med*. 2020; 17(4): 896-909.
82. Wyman O. Informe: El impacto económico y social del cáncer en España. AECC; 2020.
83. Lu Y., Xue J., Deng T., Zhou X., Yu K., et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature Med*. 2020; 26: 732-740.
84. Stadmauer E.A., Fraietta J.A., Davis M.M., Cohen A.D., Weber K.L., Lancaster E., et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020; 367 (6481): 1-19.

- 85.** Rapoport A.P., Stadtmauer E.A., Binder-Scholl G.K., Goloubeva O., Volgl D.T., Lacey S.F., et al. NY-ESO-1 specific TCR engineered T-cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in mieloma. *Nature Med.* 2015; **21(8)**:914-921.
- 86.** Xu L., Wang J., Liu Y., Liangfu X., Su B., Mou D., et al. CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia. *N Eng J Med.* 2019; 381(**13**): 1240-1247.
- 87.** Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015; 6(5): 363-372.

ANEXO

ANEXO TABLA 1

Anexo Tabla1. Comparación entre ZNF, TALEN y CRISPR/Cas9. Estas tres estrategias actúan mediante nucleasas quimeras capaces de reconocer específicamente una región concreta de DNA. Sin embargo, la elaboración de ZNF y TALEN no solo es mucho más cara sino también más laboriosa. De hecho, la endonucleasa *folk*, que es la que se utiliza en los casos de ZNF y TALEN, ha de ser modificada por cada gen que se quiera identificar, es decir, se debe diseñar un dominio de unión específico para cada secuencia diana. Cas9, en cambio, es capaz de ejercer su acción de corte en cualquier punto del genoma, mediante la simple modificación de las secuencias del R_NA guía (Li et al., 2020).

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Recognition site	Zinc-finger protein	RVD tandem repeat region of TALE protein	Single-strand guide RNA
Modification pattern	Fok1 nuclease	Fok1 nuclease	Cas9 nuclease
Target sequence size	Typically 9–18 bp per ZFN monomer, 18–36 bp per ZFN pair	Typically 14–20 bp per TALEN monomer, 28–40 bp per TALEN pair	Typically 20 bp guide sequence + PAM sequence
Specificity	Tolerating a small number of positional mismatches	Tolerating a small number of positional mismatches	Tolerating positional/multiple consecutive mismatches
Targeting limitations	Difficult to target non-G-rich sites	5' targeted base must be a T for each TALEN monomer	Targeted site must precede a PAM sequence
Difficulties of engineering	Requiring substantial protein engineering	Requiring complex molecular cloning methods	Using standard cloning procedures and oligo synthesis
Difficulties of delivering	Relatively easy as the small size of ZFN expression elements is suitable for a variety of viral vectors	Difficult due to the large size of functional components	Moderate as the commonly used SpCas9 is large and may cause packaging problems for viral vectors such as AAV, but smaller orthologs exist
ZFN Zinc-finger nuclease, TALEN Transcription activator-like effector nuclease, CRISPR Clustered regularly interspaced short palindromic repeat			

ANEXO TABLA 2

Anexo Tabla 2. Características principales de los pacientes involucrados en el estudio de Lu *et al.*, 2020.

Characteristics	Cohort				Total (n=12)
	Pre-A (n=2) 2×10 ⁷ /kg	A (n=4) 1×10 ⁷ /kg	B (n=3) 2×10 ⁷ /kg	C (n=3) 4×10 ⁷ /kg	
Age, median (range), years	55·5 (48–63)	56 (48–66)	55 (31–68)	53 (47–61)	54·5 (31–68)
Sex, n (%)					
Male	2 (100)	2 (50)	1 (33)	3 (100)	8 (67)
Female	0 (0)	2 (50)	2 (67)	0 (0)	4 (33)
Smoking status, n (%)					
Never smoker	0 (0)	2 (50)	3 (100)	0 (0)	5 (42)
Current/former smoker	2 (100)	2 (50)	0 (0)	3 (100)	7 (58)
ECOG performance status, n (%)					
0	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (33)	2 (17)
1	2 (100)	3 (75)	3 (100)	2 (67)	10 (83)
Tumor histology, n (%)					
Squamous	1 (50)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	2 (17)
Non-squamous	1 (50)	4 (100)	2 (67)	3 (100)	10 (83)
CNS metastases, n (%)	0 (0)	2 (50)	1 (33)	2 (67)	5 (42)
Prior intracranial radiation, n (%)	0 (0)	2 (50)	1 (33)	1 (33)	4 (33)
Mutational status, n (%)					
EGFR+	0 (0)	1 (25) [*]	1 (33) [#]	1 (33) ^{&}	3 (25)
ALK+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PD-L1 expression, n (%)					
<50%	0 (0)	2 (50)	3(100)	1 (33)	6 (50)
≥50%	2 (100)	2 (50)	0 (0)	2 (67)	6 (50)

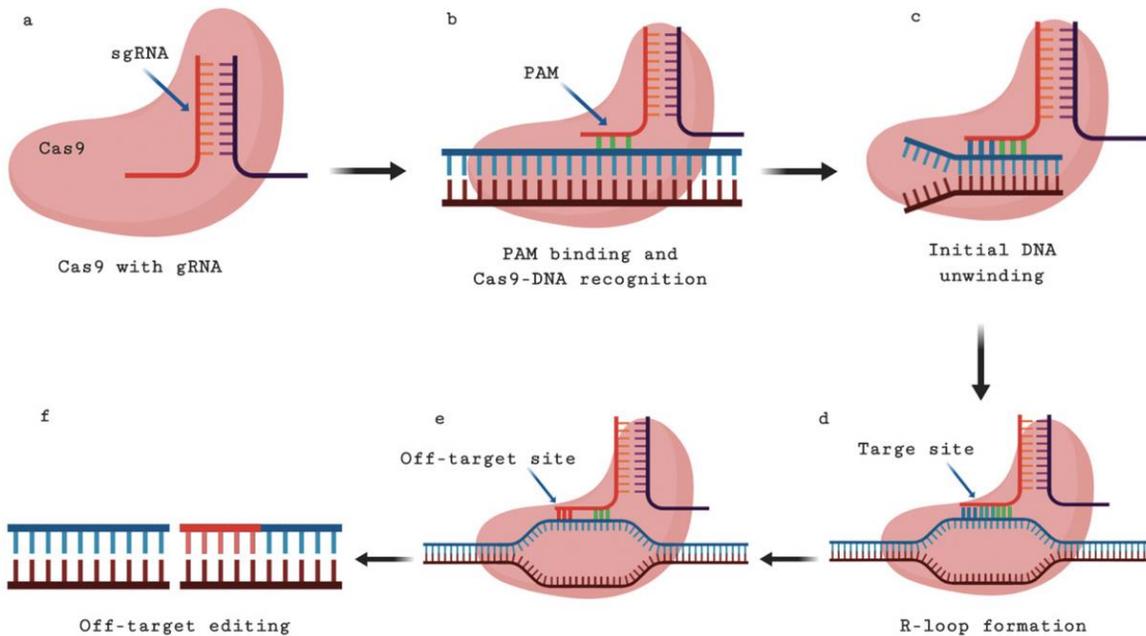
EGFR+, mutation(s) in the EGFR gene.

ALK+, rearrangements in anaplastic lymphoma kinase (ALK).

CNS, central nervous system; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; PD-L1, programmed death ligand-1;

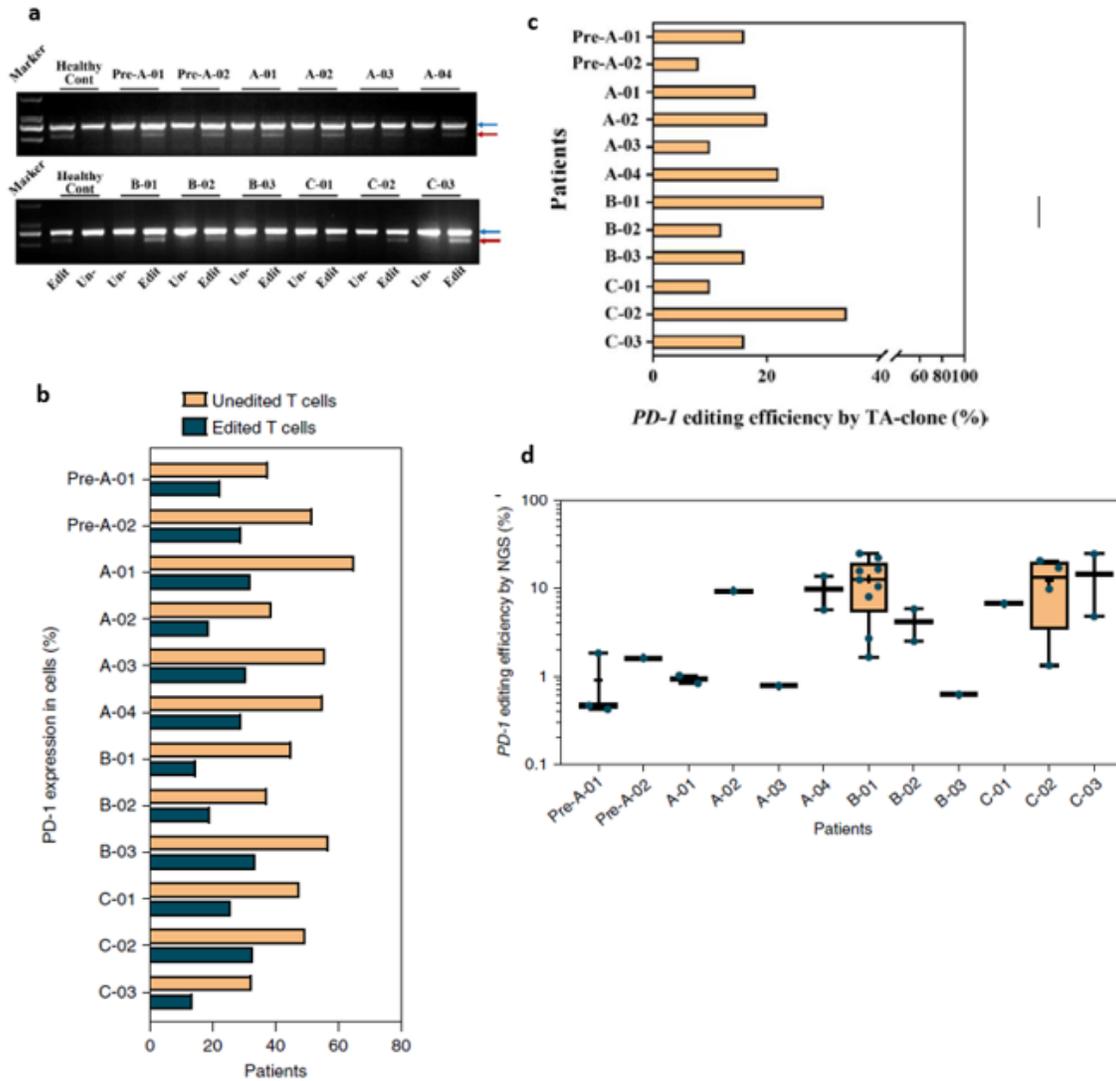
* EGFR L858R mutation; # EGFR 19 del mutation; & EGFR L861Q mutation

ANEXO FIGURA 1



Anexo fig.1. Mecanismo de los eventos “off-target” Los sistemas CRISPR/Cas9 toleran hasta tres errores de apareamiento (“mismatches”) por cada secuencia de 20 pares de bases de DNA. a, b) unión y reconocimiento de la región diana adyacente a PAM. c) las hebras de DNA se desenrollan. d) se forma un bucle para estabilizar la unión entre el sgRNA y el DNA diana. e) el sgRNA reconoce algunos “mismatches” fuera de la secuencia diana. f) si el número de “mismatches” es mayor a 3, se genera una edición “off-target” (Manghwar *et al.*, 2020).

ANEXO FIGURA 2 (Lu *et al.*, 2020).



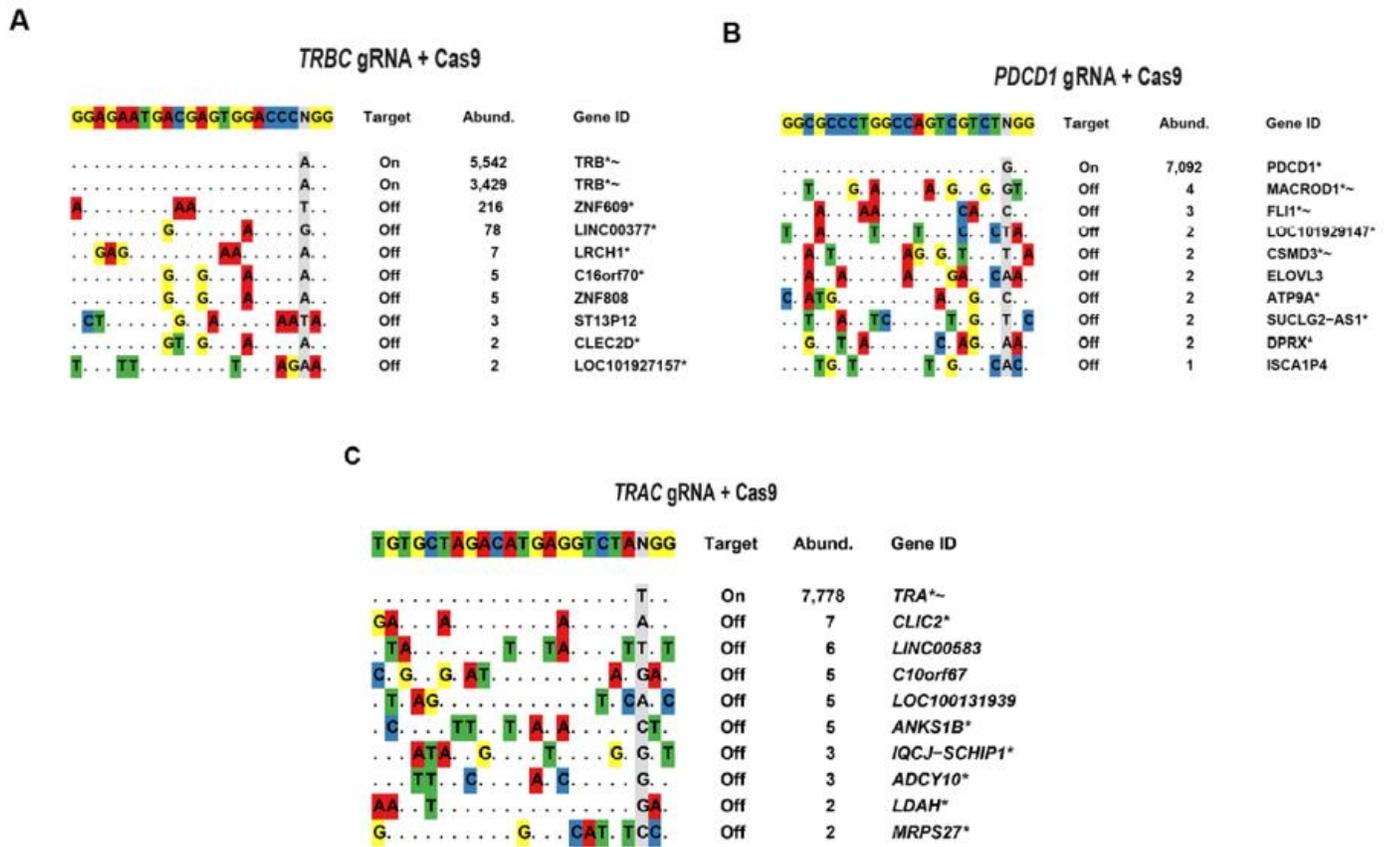
Anexo Fig.2. Métodos empleados para evaluar la eficiencia de edición genética de las células T. **a.** T7E1 surveyor: en esta imagen se muestra el DNA amplificado de células T editadas y células T no editadas (procedentes de un paciente sano control). La flecha azul indica las regiones de DNA que no han sufrido mutación. La flecha roja indica las regiones de DNA que fueron identificadas por la endonucleasa T7E1 y que por tanto, sufrieron mutación. **b.** esta figura muestra los niveles de expresión de PD-1 en células T editadas con respecto a células T no editadas en diferentes pacientes de la muestra. **c.** El día 21 tras la electroporación, se midió la eficiencia de edición de PD-1 mediante “TA-cloning”. **d.** La frecuencia de la eficiencia de edición fue medida mediante NGS. El diagrama de caja y bigotes muestra dicha frecuencia: Las cajas representan los valores desde el cuartil más bajo al más alto; la línea central de las cajas representa la mediana; las líneas que sobresalen de las cajas (“bigotes”), representan los valores mínimos y máximos. Cada punto representa la eficiencia de edición de las células infundidas en un ciclo individual (Lu *et al.*, 2020).

ANEXO TABLA 3 (Stadtmauer *et al.*, 2020)

Anexo tabla 3. Resumen de los efectos adversos observados durante el estudio (Stadtmauer *et al.*, 2020).

AE Category	Toxicity	All Grades	Grade 1/2	Grade 3/4
Hematologic	Anemia	2	1	1
	Leukopenia	4	-	4
	Neutropenia	4	1	3
	Thrombocytopenia	6	3	3
	Lymphopenia	1	-	1
Infection	Upper Respiratory	1	1	-
	Febrile Neutropenia	2	-	2
Electrolyte	Hypercalcemia	1	1	-
	Hyperphosphatemia	1	1	-
	Hypoalbuminemia	1	1	-
	Hypocalcemia	3	2	1
	Hypokalemia	1	1	-
	Hypomagnesemia	1	1	-
	Hyponatremia	1	1	-
	Hypophosphatemia	1	-	1
Neurologic	Dysgeusia	1	1	-
	Headache	1	1	-
	Paresthesia	2	2	-
	Syncope	1	-	1
	Pain	3	3	-
Renal	Acute kidney injury	1	1	-
	Urinary obstruction	1	-	1
Respiratory	Aspiration	1	-	1
	Nasal congestion	1	1	-
	Cough	2	2	-
Gastrointestinal	Lower GI bleed	1	1	-
	Vomiting	1	1	-
Other	Alopecia	1	1	-
	Phlebitis	1	1	-
	LE edema	1	1	-
Total		50	30	20

ANEXO FIGURA 3 (Stadtmauer *et al.*, 2020).



Anexo fig.3. Eventos on-target y off-target para los genes TRBC (A), PDCD1 (B) y TRAC(C). Obsérvese como el número de eventos off-target detectados fue algo mayor para el gen TRBC. No obstante, en todos los casos prevalece el número de eventos on-target (Stadtmauer *et al.*, 2020).

ANEXO TABLA 4.a.: EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGO (Lu et al., 2020).

Anexo tabla 4.a. Evaluación del riesgo de sesgo del estudio de Lu *et al.*, en función de los criterios propuestos por el manual Cochrane.

Ítem	Evaluación	Apoyo para la valoración
Generación de la secuencia aleatorizada (sesgo de selección)	Alto riesgo	Cita “de acuerdo con el diseño de estudio, los pacientes serán asignados a un grupo específico de tratamiento sin aleatorización”
Ocultación de la asignación (sesgo de selección)	Alto riesgo	No se elabora ningún protocolo aleatorio para la asignación de pacientes y por tanto, tampoco hay ocultación de la asignación.
Cegamiento de los participantes (sesgo de realización)	Bajo riesgo	Cita “Esto es un estudio abierto en fase I”. No hay cegamiento de los participantes pero dado que todas las cohortes reciben el mismo tratamiento, no es probable que los resultados estén influidos por la falta de cegamiento.
Cegamiento del personal (sesgo de realización)	Bajo riesgo	Se trata de un ensayo abierto. No hay cegamiento del personal pero dado que todas las cohortes reciben el mismo tratamiento, no es probable que los resultados estén influidos por la falta de cegamiento.
Cegamiento de los evaluadores (sesgo de detección)	Riesgo poco claro	No hay suficiente información acerca de los evaluadores del estudio. Nota: el cegamiento probablemente no fue realizado pero incluso en este caso es poco probable que esto haya sesgado los resultados.
Manejo de los datos de resultado incompletos (sesgo de desgaste)	Bajo riesgo	Hubo una pérdida temprana durante el estudio, por lo que no se pudo evaluar la respuesta clínica en dicho sujeto. No obstante, los resultados medidos en este paciente antes de su retirada están disponibles No hay datos de resultado faltantes en los pacientes que completaron el estudio.
Notificación selectiva (sesgo de notificación)	Bajo riesgo	En el protocolo de estudio se describen las variables de interés de forma preespecificada. Todos los resultados de dichas variables se describen en el estudio independientemente de si son o no estadísticamente significativas.

ANEXO TABLA 4.b.: EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGO (Stadtmauer et al., 2020).

Anexo tabla 4.b. Evaluación del riesgo de sesgo del estudio de Stadtmauer et al., en función de los criterios propuestos por el manual Cochrane.

Item	Evaluación	Apoyo para la valoración
Generación de la secuencia aleatorizada (sesgo de selección)	Alto riesgo	Se tratan únicamente tres pacientes y ninguno de ellos es asignado a un grupo específico. No se describe ningún proceso de aleatorización.
Ocultación de la asignación (sesgo de selección)	Alto riesgo	No se elabora una generación de la secuencia aleatorizada y por tanto, tampoco hay ocultación de la secuencia.
Cegamiento de los participantes (sesgo de realización)	Bajo riesgo	Se trata de un ensayo abierto dónde los tres pacientes tratados reciben el mismo tratamiento. Es poco probable que la falta de cegamiento de los participantes haya sesgado los resultados.
Cegamiento del personal (sesgo de realización)	Bajo riesgo	No hay cegamiento de los investigadores pero dado que se administra el mismo tratamiento a toda la muestra, es poco probable que esto haya sesgado los resultados.
Cegamiento de los evaluadores (sesgo de detección)	Riesgo poco claro	No hay suficiente información acerca de los evaluadores del estudio. Nota: el cegamiento probablemente no fue realizado pero incluso en este caso es poco probable que esto haya sesgado los resultados.
Manejo de los datos de resultado incompletos (sesgo de desgaste)	Bajo riesgo	No hay datos de resultados faltantes. Los resultados de las variables medidas se muestran para cada uno de los pacientes implicados.
Notificación selectiva (sesgo de notificación)	Riesgo poco claro	En el protocolo no se describen claramente todas las variables que se pretende medir posteriormente en el estudio. Si bien dichas variables sí aparecen descritas a lo largo del estudio, no se muestran de forma preestablecida en ningún documento.

MATERIAL COMPLEMENTARIO: ENTREVISTA A FRANCIS MOJICA

Esta entrevista fue realizada el 9 de marzo del 2021 en el departamento de Microbiología de la facultad de ciencias de la Universidad de Alicante.

P: Buenos días doctor Mojica, es todo un honor que pueda recibirnos. Cómo ya sabrá, estamos realizando una revisión sistemática sobre la aplicación clínica de CRISPR. Usted fue la primera persona en descubrir la función de este curioso sistema en el genoma de una arquea. Cuéntenos, ¿qué supuso para usted ese momento?

R: Buenos días, encantado de recibirla. Pues bien, en aquella época, los métodos de secuenciación eran mucho más limitados y costosos que ahora pero, a pesar de ello, localizamos una región que podía estar relacionada con la resistencia de *Haloferox Mediterranei* a los medios salinos. A partir de ahí, nos interesamos por aquello y vimos que en el año 87 habían publicado unas secuencias similares en el genoma de *E. coli*. A nivel filogenético, estos dos organismos están tremendamente separados entre sí por lo que el origen de estas curiosas secuencias debía tener un origen mucho más antiguo a nivel evolutivo. No supimos hasta mucho tiempo después que en la misma época en la que descubrimos CRISPR, otro grupo de investigación también había localizado el sistema en *Mycobacterium*.

P: Aunque varios investigadores localizaran estas secuencias, usted consiguió describir la función inmunitaria de CRISPR. ¿Qué experimentos llevó usted a cabo para lograrlo?

R: Así es, hasta aquel momento, nunca se había estudiado profundamente aquel sistema. Desde el año 93, nos fuimos planteando varias hipótesis y poniéndolas a prueba. Yo siempre había estado preguntándome de donde provenían esos espaciadores. ¿Cómo puede ser que una región del genoma variara tanto entre procariontes de una misma especie? ¿Provenían de un ancestro?

De esta forma, siempre que secuenciaba algún espaciador, lo introducía en una base de datos para ver si coincidía con alguna secuencia conocida. De repente, un día vi que una de esas secuencias espaciadoras coincidía con la del genoma de un virus que infectaba a *E. coli*. Pensé que era una simple casualidad pero seguí buscando y volvió a producirse una nueva coincidencia con el genoma de un plásmido. De esta forma, repetí el proceso con unos 4500 espaciadores de más de 80 especies distintas de procariontes y se

produjeron una enorme cantidad de coincidencias con genomas de fagos que infectaban a *sulfolobus*, *streptococcus*, etc.

P: ¿Cómo intuyó que la presencia de material vírico o de plásmido en los loci CRISPR de los procariotas les otorgaban resistencia?

R: Observé que dentro de una misma especie, concretamente en *Streptococcus*, algunas cepas que no contenían esos espaciadores, eran sensibles a la infección por virus o plásmidos. Por lo contrario, en las cepas donde sí estaban presentes los espaciadores, no se observaba la presencia de ningún fago. Este proceso se repetía en distintas especies.

De esta forma, intentamos comprobar la resistencia a la infección de aquellos procariotas que contenían ellos espaciadores. Sin embargo, aquel experimento no dio buenos resultados. No fue hasta el 2007, cuando el grupo de Barrangou pudo confirmar nuestra hipótesis.

P: ¿Usted se imaginaba en aquel entonces que CRISPR tendría una repercusión tan abismal como la que ha conseguido?

R: Cuando descubrí aquello, llegué a casa y dije “Hoy he encontrado algo que algún día saldrá en los libros de texto”. Aunque claro, yo pensaba que su repercusión no iría más allá del campo de la microbiología y hoy en día su aplicación engloba una gran variedad de ámbitos.

P: ¡Y tanto que ha acabado saliendo en los libros de texto! Efectivamente su aplicación es tremendamente amplia. ¿Cuánto tardó en visibilizarse este gran hallazgo? ¿Fue una repercusión progresiva?

R: Si observas un gráfico de la evolución de las publicaciones acerca de CRISPR, puedes ver como al principio apenas se publicaba nada, tal vez un artículo cada 5 años. Poco a poco, los artículos empezaban a publicarse cada año. Cuando se descubrió su función como sistema inmunitario de células procariotas, se ve un ascenso en la gráfica. Finalmente, a partir del año 2012, cuando se describió su función como herramienta de edición genética, las publicaciones sobre CRISPR han crecido casi de forma exponencial.

P: ¿En qué ámbito cree usted que CRISPR ha tenido su mayor impacto?

R: Sin duda, la aplicación de CRISPR como herramienta molecular de edición genética ha sido lo que más repercusión ha tenido. Las diferencias abismales de este sistema con respecto a otras herramientas de edición han permitido su triunfo. Además, el hecho de que CRISPR haya captado tanto interés dentro de la

comunidad científica, ha logrado la cooperación de grandes centros de investigación y por lo tanto, su gran desarrollo.

P: ¿Cómo es posible que CRISPR haya pasado de ser un sistema en un principio, de interés exclusivamente biológico a ser un sistema tan ampliamente utilizado en campos de conocimiento tan diversos?

R: CRISPR es como un cerdo ibérico, se aprovecha absolutamente todo de él. Identifica, corta, modifica, etc. Incluso la primera parte del proceso, es decir, la integración del material genético viral resulta de utilidad. Por ejemplo, podemos utilizar bacterias intestinales como “testigos” de infecciones pasadas. Si una bacteria de nuestro organismo adquiere un determinado gen de un virus, podemos deducir que en algún momento probablemente nos infectamos por dicho virus.

P: Ja, ja, es un símil muy acertado. Ahora incluso, no sólo se está investigando el potencial de CRISPR sino también antagonistas para frenar su función, cómo los llamados “anti-CRISPR”.

R: Así es. CRISPR es una herramienta tan potente que conviene limitar su tiempo de acción al utilizarlo en organismos eucariotas. Hay distintos métodos para hacerlo. Por ejemplo, ahora se están elaborando nuevos procesos de transferencia de los sistemas CRISPR mediante nanopartículas para que sólo actúe en regiones muy localizadas. Por otro lado, los anti-CRISPR son proteínas encontradas en fagos, que inhiben la función de CRISPR.

P: ¿Qué proyectos de investigación están llevando actualmente a cabo en su laboratorio?

R: Casualmente estamos colaborando con dos grupos de Dinamarca y San Francisco para desarrollar los anti-CRISPR. De momento, los anti-CRISPR que se conocen actúan en la última etapa del proceso, es decir, en la fase de reconocimiento y corte del genoma. Nosotros nos hemos planteado que pueda haber anti-CRISPR que también actúen en la primera fase del proceso, es decir, en la adquisición del material genético. A nivel práctico esto no tiene tanta utilidad pero a nivel biológico es maravilloso. Tal vez deberíamos tener una mente más aplicada (bromea).

P: ¿Cuáles son los proyectos de CRISPR que más se están desarrollando a nivel global?

R: Ahora mismo el “boom” consiste en descubrir tipos novedosos de CRISPR. Existe una gran variedad de clases, tipos y subtipos y probablemente esta clasificación no se amplíe mucho más. No obstante, el objetivo se centra más bien en descubrir aunque sea una variante, algo distinto con respecto a los sistemas conocidos.

P: ¿Ustedes también están investigando en la misma línea?

R: Sí, así es. Además de trabajar con los anti-CRISPR, también estamos intentando descubrir una nueva variante dentro de los sistemas CRISPR. Al fin y al cabo, estos son los proyectos que más financiación reciben y nosotros competimos contra gigantes de la ciencia, con muchos más recursos y datos. Hay que saber adaptarse.

P: Además de proponer la función de los sistemas CRISPR, ustedes también describieron la región “PAM” de los sistemas CRISPR. ¿No es así?

R: Las regiones PAM ya se habían descubierto pero nosotros fuimos los primeros en describirlas. Básicamente, el motivo PAM es una secuencia de unos 3-5 pares de bases que se encuentra adyacente (“río arriba”) de la región de DNA blanco. Estas secuencias adyacentes al protoespaciador, permiten que el reconocimiento por parte del crRNA y la proteína Cas sea más preciso. Además, el reconocimiento de PAM permite evitar la autoinmunidad ya que sin él, la endonucleasa Cas podría inducir cortes en su propio genoma.

P: En fin, es curioso cómo los humanos cogemos elementos de la naturaleza y lo transformamos para el beneficio propio.

R: ¡Sí, la verdad es que sí!

P: ¿Cree usted que se aplicará en células germinales? ¿Dónde piensa que está el límite ético?

R: Me lo he preguntado muchas veces y sigo sin encontrar respuestas al respecto. Lo primero que te pide el cuerpo es “¿Sí podemos evitar enfermedades incapacitantes o incluso letales, por qué no hacerlo? Especialmente esto te lo planteas cuando hablas con familias que viven el sufrimiento de un hijo enfermo. Pero por otro lado, concebir un hijo modificado “a la carta” es otra historia.

P: Es algo que resulta un poco escalofriante. Está claro que una gran mayoría estaría de acuerdo en cuanto a la prevención de enfermedades graves pero ¿quién nos dice que no puedan surgir laboratorios privados que puedan modificar a tu futuro hijo o hija para perfeccionar sus rasgos y capacidades?

R: Exacto. ¿Dónde termina realmente el concepto de enfermedad? Por ejemplo, para algunas personas una cuestión estética puede resultar algo grave a nivel emocional. ¿Por qué no crear por ejemplo a individuos con habilidades deportivas mejoradas?

Además, en caso de que esto llegue a producirse, también podría generar desigualdades sociales ya que ¿quién podría permitirse esas modificaciones genéticas? Es abrir una caja peligrosa. El caso es que la posibilidad está ahí y sin duda, se necesita una legislación que lo regule.

P: ¿Cree usted que se llegará a normalizar la modificación de embriones en un futuro?

R: Pues, pienso que todo esto que nos planteamos ahora no se verá tan extraño en un futuro. La mentalidad social va variando con el tiempo. Pensemos por ejemplo en la reproducción asistida, que también daba miedo en sus inicios y ahora sin embargo, se ha normalizado.

P: CRISPR da hasta para cuestiones filosóficas.

R: ¡Totalmente!

P: En la historia de CRISPR, hay varias figuras importantes pero también han surgido polémicas con respecto a la “carrera de las patentes”, las publicaciones, etc. ¿Qué puede decirnos usted al respecto?

R: La ciencia en general es un mundo muy competitivo, hay que tener paciencia. Desde que obtienes resultados de un estudio hasta que se publica, pasan muchos meses y a veces es desesperante.

P: Virginijus Siksnys publicó resultados muy similares a Doudna y Charpentier y sin embargo, no obtuvo tanto reconocimiento. Esto fue algo controvertido en su momento. ¿Qué piensa usted?

R: Bueno, es cierto que publicaron resultados similares pero la diferencia es que Emmanuelle y Jennifer identificaron todos los elementos necesarios para llevar a cabo una restricción programada del ADN: Cas9, crRNA y tracrRNA, cosa que Virginijus no describió.

P: Sin duda el mérito de las investigadoras es innegable.

R: Sí, es indiscutible. Pusieron las bases fundamentales para elaborar una herramienta de edición genética.

P: En cualquier caso, ninguno de los que llegaron después podrían haber desarrollado lo que han desarrollado sin su descubrimiento inicial en el 93. Eso sí que tiene mérito.

R: Sí bueno, el simple hecho de que tu campo de estudio se haya desarrollado gracias a ese descubrimiento, ya es una satisfacción y un reconocimiento personal enorme.

P: El hecho de que usted no recibiera el premio Nobel en el año 2020 también generó mucha polémica. Supongo que se lo habrán dicho muchas veces.

R: Sinceramente yo nunca pensé que me lo fueran a dar. La verdad es que pensaba que se lo darían a Doudna, Charpentier y Feng Zhang. Al final, sin embargo, ese tercer puesto no fue ocupado por nadie. Si se hubieran dado diez premios y no llego a estar ahí, no entendería nada pero en ese caso, no me sorprendió tanto.

P: Resulta bastante injusto que la base de un descubrimiento tan potente como es CRISPR no haya sido premiada con el nobel. La única explicación posible es que hubiera muchas dudas en cuanto a quien otorgar ese tercer premio.

R: Sí, totalmente. Normalmente si no hay consenso es difícil otorgar el premio y tal vez aquel año estuvo muy discutido.

P: En cualquier caso, su contribución a CRISPR ha sido fundamental y admirable. Muchísimas gracias por concedernos esta entrevista. Ha sido un placer.