

Modelo de receptor de antígeno quimérico en la línea celular Jurkat



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina



Autor: González López, Luis Alberto

Tutor: De la Fuente García, Miguel Ángel

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Introducción a la inmunoterapia contra el cáncer con células CAR-T.....	3
1.2. Edición genética	4
1.2.1. Sistema CRISPR/Cas9.....	4
1.2.2. Mecanismo HITI (Homology-independent targeted integration)	6
1.3. Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)	7
1.3.1. Estructura del CAR.....	7
1.4. Estado actual de las terapias con células CAR-T	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Producción de los virus AAV.....	11
3.2. Generación del complejo gRNA/Cas9.....	12
3.3. Línea celular Jurkat	13
3.4. Transfección y transducción de células Jurkat.....	13
3.4.1. Conteo celular	14
3.4.2. Lavado y resuspensión en buffer	14
3.4.3. Electroporación con el Nucleofector Neón®	14
3.4.4. Adición del virus AAV.....	15
4. RESULTADOS	15
4.1. Obtención de los vectores virales	15
4.2. Comprobación de la edición por citometría de flujo.....	17
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	19
7. BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

En este TFG se explicarán los pasos necesarios para conseguir la expresión de un receptor de antígeno quimérico (CAR) en la línea celular Jurkat, así como la generación de un doble knock-out en los genes TRAC y B2M (que codifican respectivamente para el receptor de antígeno del linfocito T, TCR y para la beta2-microglobulina, proteína que forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, MHC-I). Esto se llevará a cabo mediante una herramienta de edición génica, variante del sistema CRISPR/Cas9, que se basa en el vanguardista método de unión de extremos independiente de homología (HITI) y que permitirá seleccionar una diana para realizar el corte en la doble cadena de DNA (generando el knock-out en el gen predeterminado), posibilitando la integración del material genético donado por los vectores en el lugar de la escisión.

La generación de células modificadas genéticamente, más concretamente linfocitos T, abre numerosas posibilidades para ofrecer terapias curativas en pacientes afectados por cánceres de diversa índole, ofreciendo además especificidad gracias al dominio extramembrana del CAR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción a la inmunoterapia contra el cáncer con células CAR-T

La inmunoterapia contra el cáncer es una terapia biológica que consiste en estimular el sistema inmune con el fin de eliminar las células tumorales, siendo uno de los avances más prometedores en lo que respecta al tratamiento de esta patología en los últimos años. (1)

La ingeniería genética supone la base teórica sobre la que se sustenta la terapia biológica y su historia es muy breve. La profundización en este campo comienza a finales del siglo pasado, cuando en la década de los ochenta se realiza la primera transferencia de material genético a una célula empleando un retrovirus como vector. A partir de aquí se comienza un período de intensa investigación hasta llegar al punto en que nos encontramos hoy en día, en que somos capaces de insertar genes en el genoma con una especificidad muy alta y generar receptores quiméricos que abren la

posibilidad a un tratamiento altamente eficaz del cáncer y con efectos adversos cada vez menos graves y frecuentes.

En este trabajo me centraré en un tipo de inmunoterapia que emplea células CAR-T, linfocitos T modificados genéticamente para expresar un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) que dirige la respuesta del linfocito T contra un antígeno tumoral de interés (2). Esta técnica se engloba dentro de la denominada Transferencia Celular Adoptiva, que consiste en manipular células del huésped ex vivo para incrementar su potencial antitumoral y su posterior infusión al paciente.

Actualmente son terapias autólogas, es decir, los linfocitos T se obtienen del propio individuo que más tarde se beneficiará de la terapia. Sin embargo existen líneas de investigación que buscan mejorar la eficiencia de este tratamiento eliminando mediante ingeniería genética las moléculas MHC clase I y TCR (lo que evitaría el rechazo del huésped y la enfermedad injerto contra huésped, respectivamente), con lo que se conseguiría una terapia alogénica, es decir podrían utilizarse linfocitos T derivados de otros individuos.

1.2. Edición genética

Pueden distinguirse dos variantes: la integración del material genético de forma aleatoria o dirigida. La primera es más sencilla y básica y puede realizarse mediante electroporación de ADN desnudo, sistemas de transposón/transponasa o transducción viral. En esta forma, al carecer de especificidad para la inserción del gen en el DNA de la célula huésped existe riesgo de activación oncogénica o inactivación de algún gen relevante (la llamada mutagénesis insercional). La segunda, más vanguardista y aún en desarrollo, emplea técnicas como meganucleasas, nucleasas con dedos de Zn o, la más novedosa de ellas y de la que me voy a ocupar en este trabajo, el sistema CRISPR/Cas9.

1.2.1. Sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), descubierto a finales del siglo pasado en una cepa de E.coli, supone en la actualidad una herramienta poderosa para la edición genética.

Poco después se descubriría que estas secuencias palindrómicas se encontraban asociadas a proteínas con capacidad nucleasa (Cas), suponiendo una forma de inmunidad adaptativa para las bacterias, protegiéndolas frente a infecciones virales e incluso generando memoria inmunológica hacia infecciones futuras.(3,4) (5)

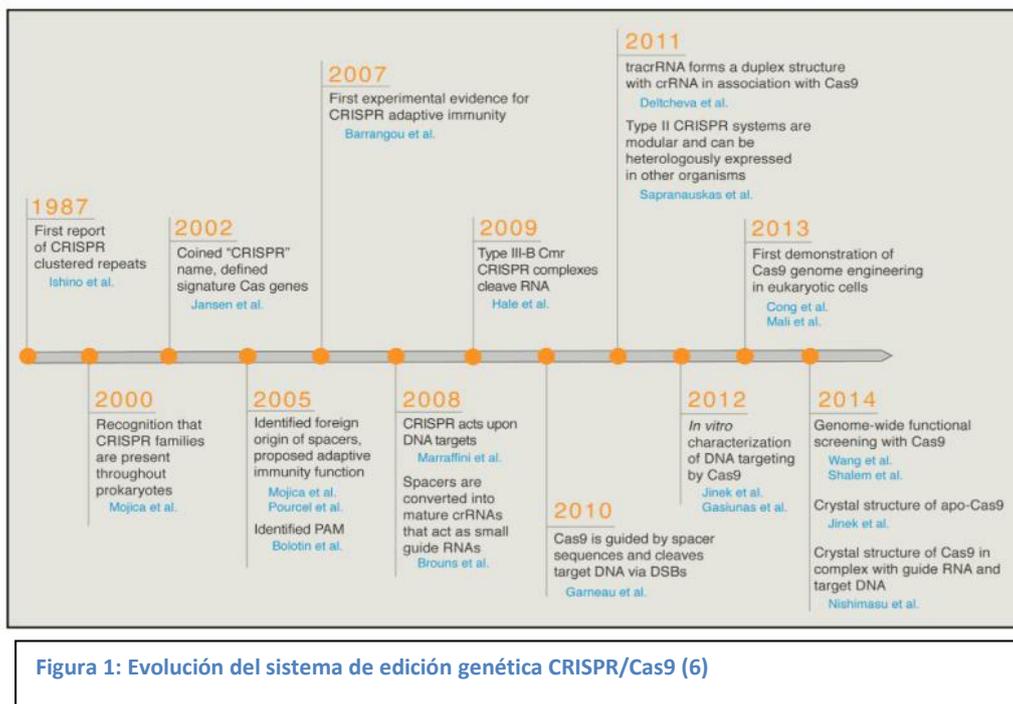


Figura 1: Evolución del sistema de edición genética CRISPR/Cas9 (6)

Las ventajas que demuestra este método frente otros es su gran especificidad a la hora de realizar cortes en la doble cadena de DNA de las células objetivo, basándose en uniones de tipo Watson y Crick entre los nucleótidos del gRNA del complejo CRISPR/Cas9 y la secuencia complementaria a esta, diana genómica sobre la que tendrá lugar la actividad nucleasa de la Cas.(7)

La especificidad de este método se consigue con la creación de gRNAs de unos 20 pares de bases, que se unirán a su diana genómica, actuando como marcadores para realizar el corte en la doble cadena de DNA.(3,4)

La existencia de una secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif) en el DNA diana resulta esencial, aunque no forme parte per se de la maquinaria de edición genética. Estos son secuencias cortas de 2-6 pares de bases que son reconocidos por una Cas en particular, encontrándose justo a continuación de la secuencia complementaria del gRNA.(3-5)

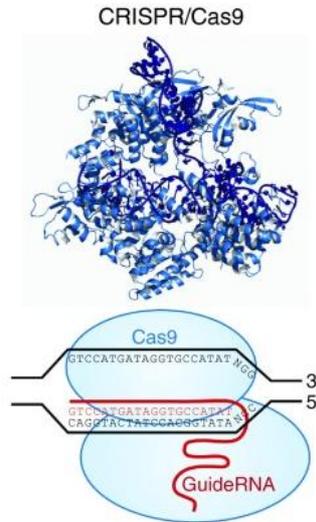


Figura 2 Esquema del complejo CRISP/Cas9 (8)

1.2.2. Mecanismo HITI (Homology-independent targeted integration)

Una vez se produzca el corte en la doble cadena de DNA, la maquinaria celular se pondrá en marcha para llevar a cabo su reparación.

Tradicionalmente se habían descrito dos mecanismos básicos para la reparación del DNA celular dañado. Por un lado la reparación directa por homología (HDR), en la cual tras el corte se produce recombinación homóloga con un fragmento de DNA donante. El problema con este mecanismo es que se trata de un proceso exclusivo de células en división.(9)

Por otro lado se encuentra la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Este mecanismo lleva a cabo la reparación de la doble cadena conllevando en la mayoría de los casos la inserción o delección de pares de bases, lo que provoca la alteración del gen y de su producto. Es un mecanismo por tanto que no permite la introducción de un gen.(10)

Ante esta disyuntiva, surge un tercer mecanismo: la integración independiente de homología (HITI). Mediante el cual, si hay un fragmento de DNA libre con extremos romos se integrará en la diana interrumpiendo el gen y permitiendo la expresión del nuevo inserto.(9,10)

1.3. Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

El CAR consiste en un receptor transmembrana donde sus subunidades tienen procedencias diferentes, de ahí su nombre. El objetivo de este trabajo consiste en explicar cómo se integra el gen que lo codifica en el genoma linfocitario, para que este lo exprese y pueda llevar a cabo su función antitumoral.

1.3.1. Estructura del CAR

El CAR consta de a) un dominio extracelular, cuya función es la de unión al ligando y dotará de especificidad al linfocito T; b) un dominio transmembrana y espaciador, que modula la capacidad de unión del linfocito a las células tumorales; y c) un dominio intracelular o de señalización, que será el responsable de iniciar la cascada de activación del linfocito T. Los resultados que cabría esperar son: la eliminación de las células tumorales por las CAR-T, así como una persistencia de estas en el organismo, lo que conferiría una vigilancia inmune continuada.(11)

Estos componentes que forman el CAR, no son producidos de forma artificial, sino que son secuencias polipeptídicas que se encuentran en la naturaleza. Así, por ejemplo, el dominio extracelular proviene de cadenas ligeras o pesadas de anticuerpos; el dominio transmembrana procede de CD8; y el dominio intracelular que es el que conforma este mismo dominio en el TCR.(12)

En la figura 3 se puede observar la estructura de distintos tipos de receptores. Tanto el TCR nativo como el transgénico (es decir, de especificidad conocida y producido de forma artificial por ingeniería genética) requieren del procesamiento del antígeno y su posterior presentación a través del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que generará señales co-estimuladoras que terminarán en la activación del linfocito. (12)

Los CAR, en cambio, carecen de cadenas beta y alfa, que se sustituyen por un dominio extracelular constituido únicamente por fragmentos de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos, otorgándoles la capacidad de reconocer de manera directa el antígeno, sin necesidad de mediación del complejo mayor de histocompatibilidad para la activación del linfocito.(11,12)

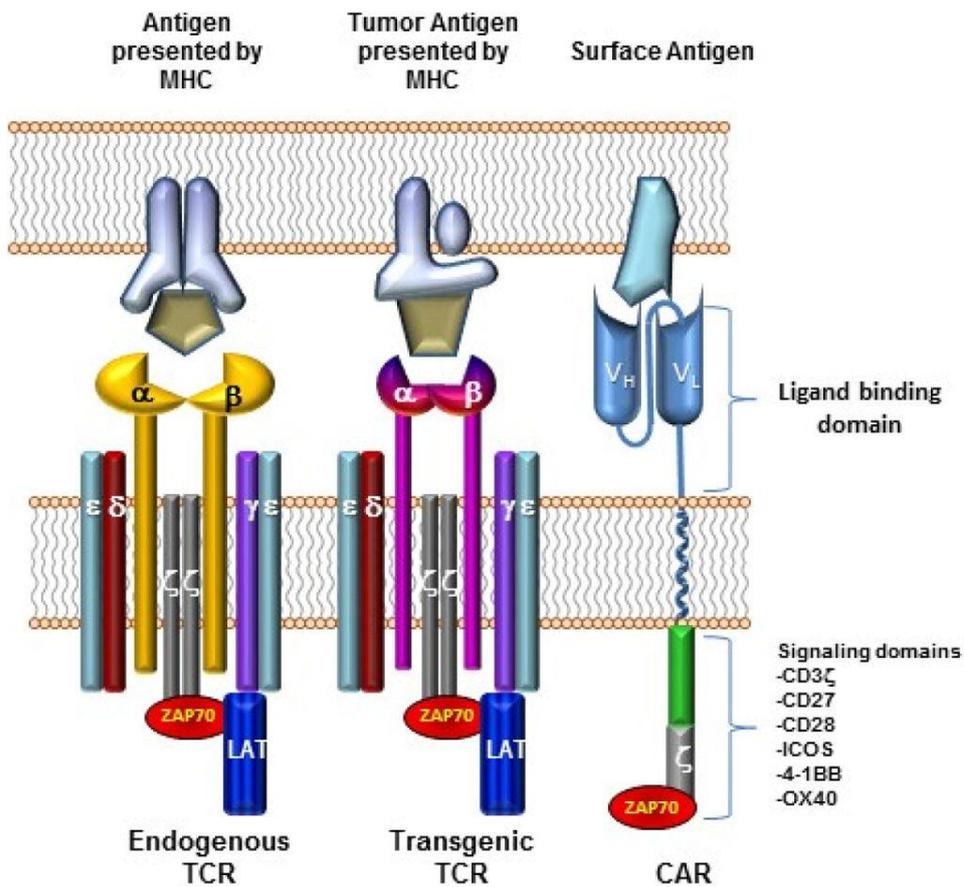


Figura 3 Comparación de los receptores TCR endógenos vs TCR modificados por ingeniería genética vs CAR (Fesnak A.D., et al. (2016))

1.4. Estado actual de las terapias con células CAR-T

Aunque la inmunoterapia con células CAR-T supone algo novedoso y que sigue en vías de desarrollo y perfeccionamiento, ya se han aplicado en algunos pacientes con linfoma y Leucemia Linfocítica Aguda con resultados prometedores. Este modelo de terapia parece ser muy adecuado y ofrecer muy buenos resultados en patologías malignas mediadas por linfocitos B (el CAR muestra especificidad por CD19, un antígeno CD que actúa de correceptor en las células B)(11).

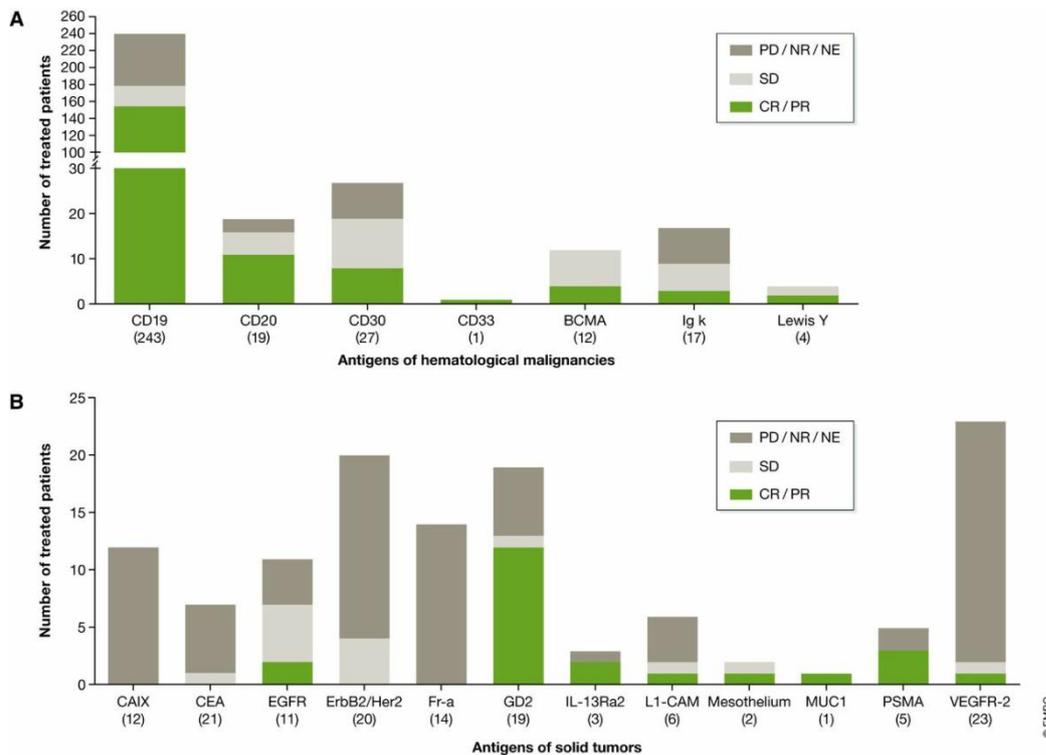


Figura 1 Representación gráfica de los resultados de varios ensayos clínicos sobre el tratamiento con células CAR-T en tumores hematológicos (A) y tumores sólidos (B). CR: respuesta completa; PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable; PD: enfermedad progresiva; NR: sin respuesta; NE: no evaluable. (Figura obtenida de Hartmann, J. et al. (2017).EMBO molecular medicine, e201607485)(12)

La FDA ha aprobado dos medicamentos donde las CAR-T son el principio activo: KymriahTM y YescartaTM. Ambos salieron al mercado en el año 2017, habiendo ofrecido muy buenos resultados en los ensayos clínicos, principalmente en tumores hematológicos. Los inconvenientes principales serían el coste (entre 375.000-475.000 \$ por tratamiento) y la posibilidad de aparición de ciertos efectos adversos de gravedad considerable, que se describen a continuación:(13)

- Tormenta de citocinas (Cytokine Release Syndrom (CRS)): aparición de fiebre, mialgias, hipotensión, hipoxia y posibilidad de fallo multiorgánico y muerte en las tres primeras semanas postinfusión. Se debe a la liberación descontrolada de citocinas, que a su vez provocan una activación exagerada del sistema inmunitario generando un cuadro de inflamación generalizada grave. El manejo de estos pacientes es muy delicado y el tratamiento debe ser agresivo, mediante inmunosupresores (corticoides o fármacos biológicos como Tocilizumab, que es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce e inactiva la IL-6.

- Neurotoxicidad: se manifiesta con síntomas neurológicos tales como confusión, delirium, alucinaciones, encefalitis, afasia, parálisis facial, mioclonías, temblores o somnolencia. El tratamiento consistirá en adoptar medidas inmunosupresoras.
- Síndrome de activación de macrófagos (MAS): se observan niveles elevados de ferritina, PCR y dímero D. También aparece hipertransaminemia y aumento de los triglicéridos.
- Aplasia de células B: se diagnostica con la detección de una hipogammaglobulinemia severa. Debe tratarse mediante una terapia de reemplazamiento de inmunoglobulinas, así como el uso de antibioterapia profiláctica si fuese necesario para evitar infecciones oportunistas.

Para la fabricación a gran escala sería también interesante que el medicamento fuese eficaz contra varios tipos tumorales, lo cual depende expresamente de la selección del dominio extracelular del CAR. Es por esto que lo rentable sería seleccionar un receptor capaz de reconocer el mayor número posible de dianas tumorales. En este aspecto, el trabajo que describo hace uso del receptor NKG2D, propio de las células Natural Killer, que tiene especificidad para hasta ocho antígenos diferentes, los cuales están sobreexpresados en células tumorales propias de enfermedades malignas como el mieloma múltiple y otros tumores sólidos(14).

2. OBJETIVOS

Este TFG nace con el objeto de modificar genéticamente la línea celular Jurkat para obtener un doble knock-out para los genes del TCR y MHC, además de integrar el gen del CAR mediante el sistema CRISPR-HITI.

En primer lugar se realizará knock-out sobre el TRAC, para anular la expresión del TCR impidiendo que se desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped. Las herramientas empleadas permitirán integrar simultáneamente el gen del CAR en dicha posición. Posteriormente se realizará el knock-out sobre el gen B2M, imprescindible para la expresión normal en membrana del MHC de clase I, confiriendo a estas células la capacidad para evadir el sistema inmune del receptor, aumentando su viabilidad a largo plazo, pues permanecerán de forma más prolongada en la circulación del paciente receptor.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Producción de los virus AAV

La producción de los virus AAV se realiza utilizando las llamadas células empaquetadoras (AAV293), mediante una co-transfección con tres plásmidos: el que contiene el transgen a insertar de interés (pAAV-MCS); un segundo plásmido que codifica para las proteínas de la cápside y alberga genes importantes para la replicación viral (pAAV-RC); y un tercero que aporta genes accesorios imprescindibles en la formación del virión (pAAV-Helper) (ver figura11).

Para llevar a cabo este proceso se mezclaron, en un tubo de 15 mL estéril, los plásmidos (9 microgramos de cada uno) junto con 111.6 microlitros de fosfato de calcio 2M. Pasados unos diez minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió al cultivo de las células receptoras AAV293. Estas se incubaron a 37°C con un CO₂ del 5% durante 48 horas.

Pasados tres días se procedería a separar las células del medio de cultivo mediante centrifugación (5 minutos a 1.100 rpm) y resuspendidas en DMEM suplementado. A continuación se procedió al lisado celular mediante 3 ciclos de congelación/descongelación.

Finalmente, se centrifugó la suspensión obtenida durante 5 minutos a 12.000 rpm, separando los restos celulares de los viriones, contenidos en el sobrenadante, el cual se almacenó (-80°C) para su posterior titulación.

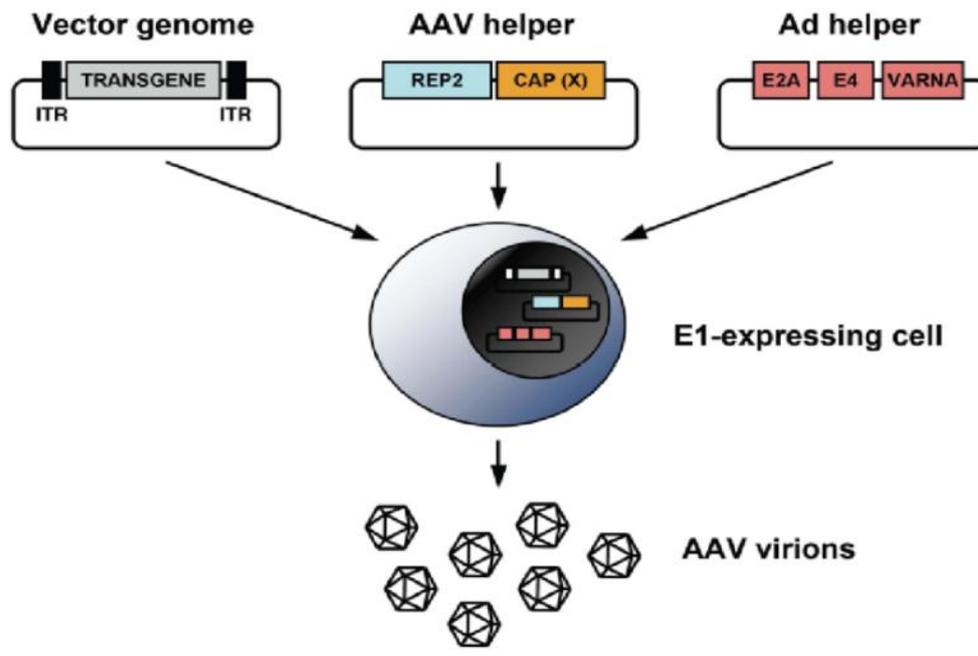


Figura 5 Transfección de plásmidos y producción de los viriones AAV

3.2. Generación del complejo gRNA/Cas9

El complejo gRNA/Cas9 será el encargado de realizar el corte en la doble cadena de DNA gracias a la propiedad endonucleasa de la Cas 9. El gRNA es una secuencia corta, de 20 nucleótidos, que hibridará con una secuencia diana complementaria en el sitio donde ocurrirá el corte de la cadena doble de DNA, lo que da especificidad al sistema. En este caso, el corte se realizará unos pocos nucleótidos antes del comienzo del exón que codifica para la región constante de la cadena alfa del receptor de la célula T (TRAC).

Para generar el RNA específico del gen TRAC, se utilizó el kit GeneArt™ PrecisiongRNASynthesis Kit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se eligió una secuencia de 20 nucleótidos presente en el gen TRAC, empleando para ello el software www.thermofisher.com/crisprdesign. Este software permite buscar las mejores dianas para CRISPR del gen de interés que contengan una secuencia PAM (necesaria esta para la actitud endonucleasa de Cas9), y también da información sobre otros posibles sitios de corte en el genoma (lo que generaría la aparición de mutaciones no deseadas, conocidas como “*off-target*”).

Una vez identificada y elegida la secuencia diana, el siguiente paso es diseñar el gRNA, compuesto por un promotor de la transcripción (tipo T7), la secuencia que codificará el gRNA específico para la diana seleccionada, y una secuencia de unos 80

nucleótidos, necesaria para la formación del complejo gRNA/Cas9. Estos tres componentes se ensamblarán mediante una PCR utilizando una mezcla establecida de primers y el producto final se utilizará para la transcripción *in vitro* según protocolo de fabricante.

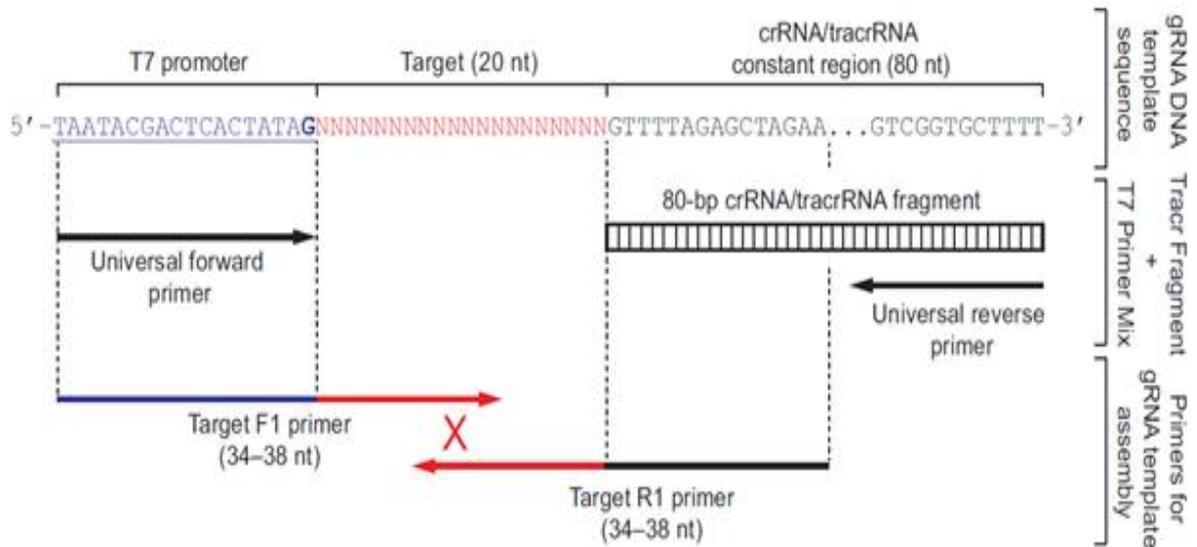


Figura 6 Ensamblaje de la PCR sobre fragmento de DNA elaborado previamente para la obtención del gRNA.

Una vez obtenido el gRNA, se procedió a formar el complejo gRNA/Cas9. Para ello se incubaron 500ng del gRNA previamente sintetizado con 1µg de la proteína Cas9 (ThermoFisher) en Buffer R (ThermoFisher) durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

3.3. Línea celular Jurkat

La línea celular Jurkat procede de linfocitos T obtenidos de un paciente con leucemia. Estas son células que han superado la barrera de la senescencia, convirtiéndose en inmortales.

En este experimento se ha optado por emplearlas en vez de Linfocitos T, ya que son menos exigentes a la hora de crecer en un medio de cultivo, multiplicándose indefinidamente sin requerir factores de crecimiento especiales, como sí necesitan los linfocitos T primarios.

3.4. Transfección y transducción de células Jurkat

En el experimento se emplean células Jurkat ya que al ser células tumorales tienen una tasa de división muy elevada, sin necesitar de mediadores ni señales de

crecimiento y proliferación celular, los cuales sí serían necesarios añadir al medio en caso de utilizar linfocitos T.

El objetivo de este paso consistirá en introducir el complejo gRNA/Cas9, que realizará el corte en la doble cadena de DNA de la línea celular Jurkat en la región del gen TRAC, lo que facilitará la inserción del transgen CAR aportado por el virus AAV descrito previamente. Esta etapa puede a su vez subdividirse en cuatro pasos:

3.4.1. Conteo celular

Para la realización del experimento se van a emplear aproximadamente un millón de células. Para la determinación de la concentración de células Jurkat en el medio de cultivo se emplean técnicas de tinción celular: se cogerán 50 microlitros de células y se le añadirá el mismo volumen de Trypan blue. El conteo se realizará empleando una Cámara de Neubauer, un instrumento consistente en un portaobjetos dividido en cuadrantes que nos permitirá realizar una fiel estimación de la concentración de células en el medio de cultivo.

En este caso se obtuvo una concentración aproximada de 300.000 células/mililitro, por lo que se requerirían unos 3.5 ml de medio de cultivo para conseguir un millón de células.

3.4.2. Lavado y resuspensión en buffer

Para la separación de las células del medio de cultivo se procedió a la centrifugación de la muestra, desechándose el sobrenadante. A continuación se resuspendió en un buffer compatible para la realización del siguiente paso, que contendría, además, los complejos gRNA/Cas9 obtenidos anteriormente.

3.4.3. Electroporación con el Nucleofector Neón®

El proceso de electroporación consiste en administrar una descarga eléctrica a la muestra celular a un voltaje determinado para provocar la formación transitoria de poros en la membrana plasmática, lo que permite la entrada del complejo ribonucleoprotéico al interior celular.

En este caso se administró una descarga de 1.200 V a una mezcla que contenía las células Jurkat y el complejo gRNA/Cas9 suspendidos en un buffer compatible con el proceso.

La electroporación ha sustituido a la transfección mediante lentivirus, los cuales ofrecían inconvenientes respecto a la seguridad (con esta forma era inevitable la

agregación de material genético del propio virus en el genoma del linfocito), además de presentar una eficacia muy inferior respecto al método actual.

3.4.4. Adición del virus AAV.

Tras un período de unas 4 horas en el que se espera que el complejo gRNA/Cas9 realice el corte en la secuencia diana del dsDNA se procede a añadir los AAV que aportarán el DNA donante –conteniente del gen CAR-. Este material genético exógeno se insertará en el genoma de la célula huésped con una eficacia variable, que será estudiada en el siguiente paso.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de los vectores virales

En nuestro caso emplearemos un vector consistente en un virus adenoasociado (AAV), que albergará como transgen nuestro CAR. La generación del transgen se basa en varios pasos de amplificación por PCR y clonación en vectores hasta conseguir una secuencia que contenga los siguientes elementos en este orden: un gRNA 5´ y la secuencia autocatalítica T2A (ver figura 5); la secuencia CAR sin promotor (ver figura 7) y la secuencia polyA, seguida por el gRNA 3´ (ver figura 9).

Será necesario comprobar la correcta inserción de las secuencias de interés en sendos plásmidos, para lo que se llevará a cabo una PCR, tras realizar una digestión enzimática de los mismos. En el caso del primer plásmido si no hay inserto se formarán dos fragmentos de 3860 pb y 780 pb; si lo hay serán de 3400 pb y 290 pb (ver figura 6); para el segundo plásmido debe formarse un fragmento de 1500 pb (ver figura 8); y para el tercero de 2000 pb (ver figura 10).

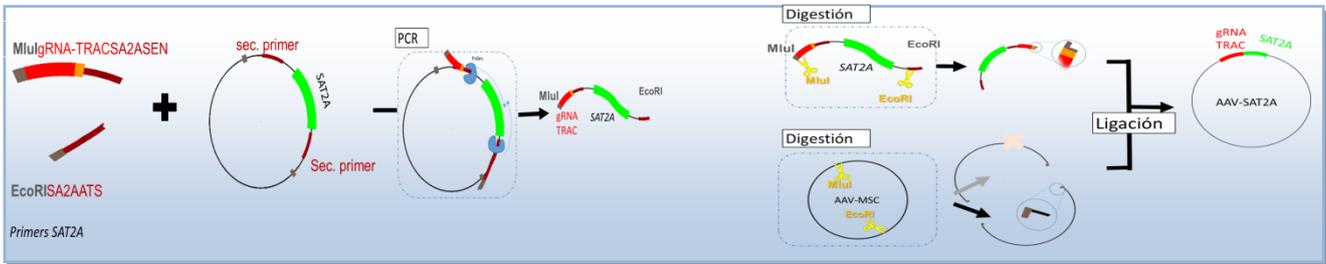


Figura 7: generación del plásmido que contiene el gRNA en 5' y la secuencia autocatalítica T2A.

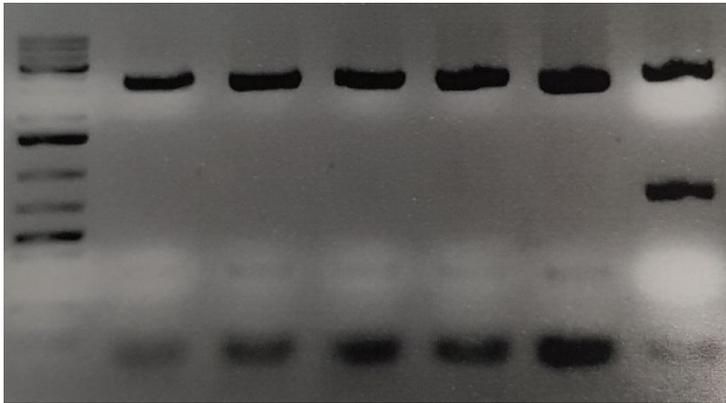


Figura 8: comprobación mediante PCR de la correcta inserción de las secuencias T2A y del gRNA.

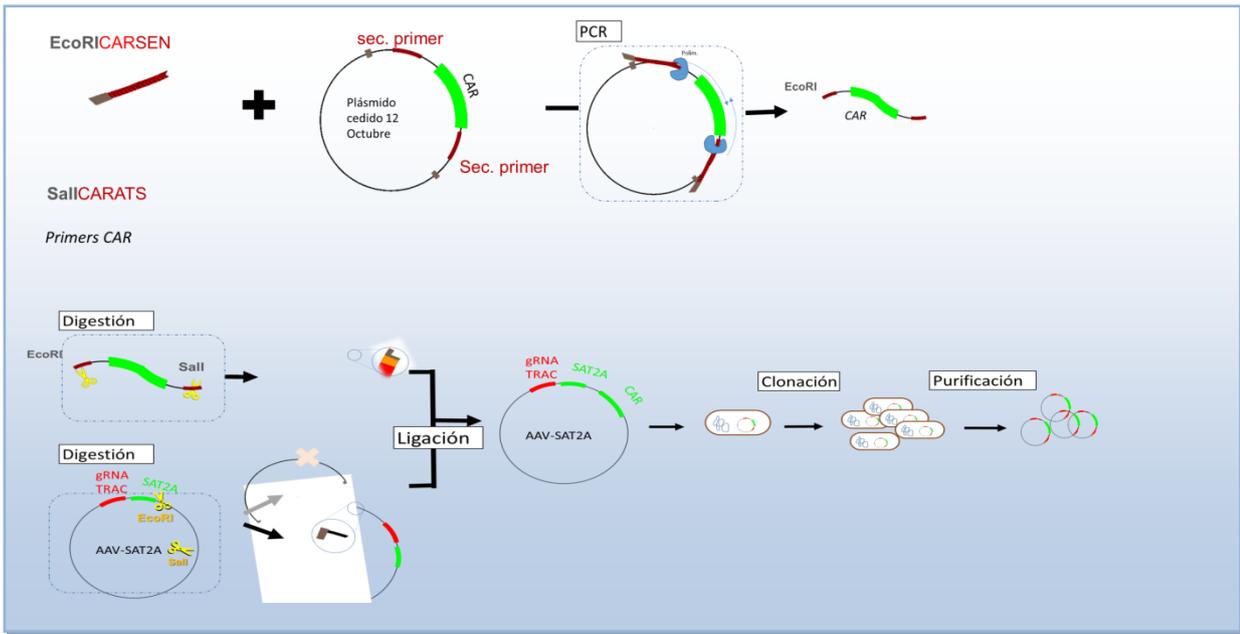


Figura 9: integración del CAR (sin promotor) en el plásmido obtenido en el proceso anterior

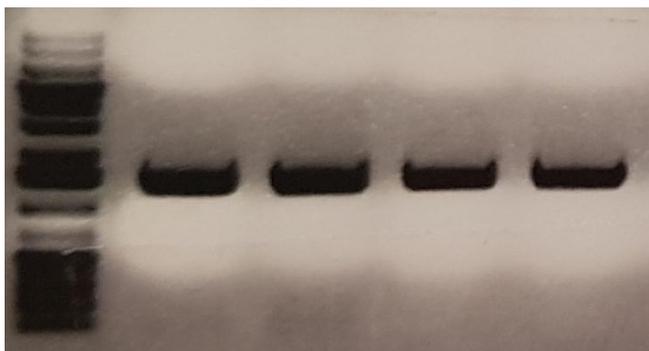


Figura 10: comprobación de la correcta inserción mediante PCR del CAR sobre el plásmido generado en el primer paso.

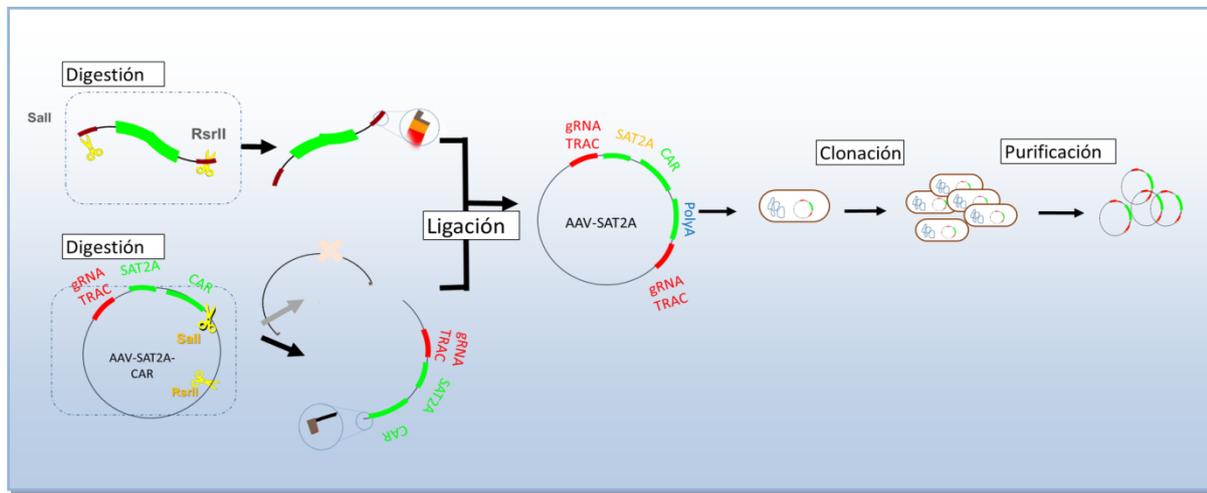


Figura 11: inserción de la secuencia PolyA y el gRNA en 3', obteniéndose el plásmido definitivo.



Figura 12: comprobación de la correcta inserción de las secuencias en el plásmido definitivo

4.2. Comprobación de la edición por citometría de flujo

Tras 48 horas de incubación en las condiciones adecuadas se procedió a la cuantificación del porcentaje de edición mediante citometría de flujo. Para ello se recogieron 50.000 células Jurkat y se marcaron con anticuerpos fluorescentes contra la proteína del TCR (PE (ThermoFisher)) y la del CAR (APC) (**fluorocromos para cada anticuerpo**). Los resultados obtenidos se analizaron con el software "Kaluza", y se muestran en la figura 13.

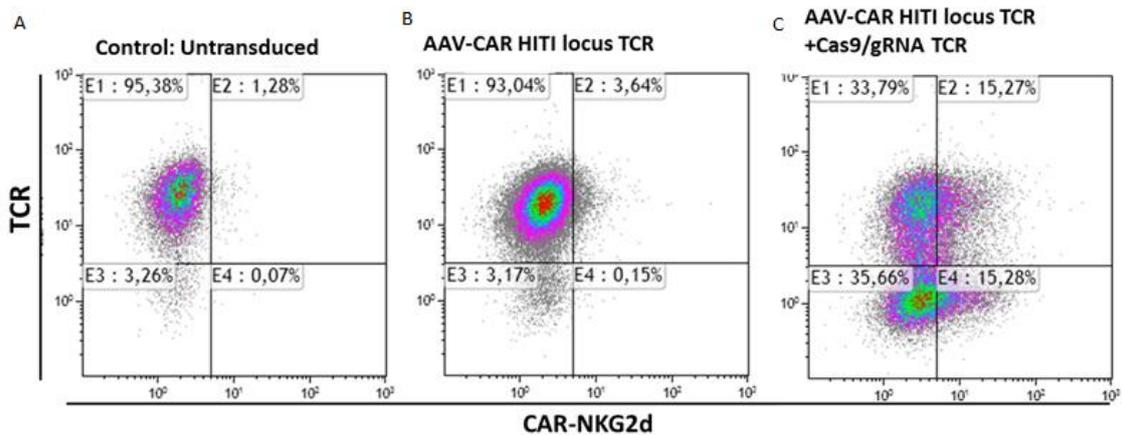


Figura 13 Resultados obtenidos en la citometría de flujo. A) muestra control: células Jurkat sin modificar, la gran mayoría presentan el TCR y carecen de CAR; B) no me acuerdo de cuales eran estas (células Jurkat en las que se ha insertado el gen CAR pero no se ha realizado el knock-out sobre TCR; C) células Jurkat del experimento, en las que se ha buscado realizar el knock-out sobre el TRAC y que se insertase el gen del CAR.

Según estos resultados se observa una eficacia del experimento del 15.28 % del total, proporción que representan las células que no expresan el TCR pero sí el CAR (ver figura 13: gráfica C, cuadrante E4). Esto es, en el 15 % de las células se ha conseguido anular la expresión de TCR y, además, la expresión en superficie del CAR.

5. DISCUSIÓN

El sistema de edición genética CRISPR/Cas9 ha supuesto un avance inconmensurable en el ámbito de la biomedicina, permitiendo silenciar genes e insertar otros de interés con una precisión nunca antes vista. Además la implementación del método con el denominado HITI ha conseguido aumentar su eficacia e incluso hace posible plantearse la idea de la modificación genética *in vivo* en un futuro(9).

Aun a pesar de las carencias que todavía es posible encontrar en las técnicas de edición genética, es necesario tener en cuenta que se trata de un campo muy novedoso y que se encuentra en pleno desarrollo, avanzando a pasos agigantados y con unas perspectivas muy positivas en cuanto a las potenciales aplicaciones que pueden tener en el mundo de las enfermedades de origen genético, principalmente en el cáncer.(15)

6. CONCLUSIONES

Aunque la aplicación de terapias con células CAR-T es actualmente todavía escasa, suponiendo fármacos de tercera o cuarta línea para procesos malignos refractarios al resto de tratamientos más “convencionales”, los ensayos clínicos existentes muestran una buena tasa de respuesta en determinados tipos de tumores, con unos efectos adversos potencialmente peligrosos pero poco frecuentes.(16)

La terapia con células CAR-T se está desarrollando a pasos agigantados debido a los múltiples usos que se le puede dar en función del antígeno que sea capaz de reconocer el receptor quimérico generado. Otras líneas de investigación trabajan en minimizar los efectos secundarios, aumentar la viabilidad de las células una vez transfundidas o incluso generar una terapia con CAR-T alogénica, creando células de uso universal, es decir aplicables a cualquier paciente, lo que reduciría muy significativamente los costes de producción y, por tanto, del tratamiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest.* septiembre de 2015;125(9):3335-7.
2. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science.* 3 de abril de 2015;348(6230):62-8.
3. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 28 de noviembre de 2014;346(6213):1258096.
4. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols.* noviembre de 2013;8(11):2281-308.
5. Lóez YA. Ingeniería Genómica mediante Sistemas CRISPR-Cas. :48.
6. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 5 de junio de 2014;157(6):1262-78.
7. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem.* 2 de junio de 2016;85:227-64.

8. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther.* marzo de 2016;24(3):430-46.
9. 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. *Nature.* 01 de 2016;540(7631):144-9.
10. Suzuki K, Izpisua Belmonte JC. In vivo genome editing via the HITI method as a tool for gene therapy. *J Hum Genet.* febrero de 2018;63(2):157-64.
11. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Molecular Medicine.* 2017;9(9):1183-97.
12. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 23 de 2016;16(9):566-81.
13. LLS Home [Internet]. [citado 3 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.lls.org>
14. Demoulin B, Cook WJ, Murad J, Graber DJ, Sentman M-L, Loney C, et al. Exploiting natural killer group 2D receptors for CAR T-cell therapy. *Future Oncol.* agosto de 2017;13(18):1593-605.
15. Pettitt D, Arshad Z, Smith J, Stanic T, Holländer G, Brindley D. CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape. *Mol Ther.* 7 de febrero de 2018;26(2):342-53.
16. LaRussaA. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy [Internet]. 2015 [citado 3 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/immunotherapy/chimeric-antigen-receptor-car-t-cell-therapy>