

Application of the CRISPR/Cas9 gene editing system in the treatment of diseases with a focus on cancer

Farnoosh Nemati^{1*}, Jaleh Tahsili²

1. Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.
2. PhD in Plant Physiology, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

* Corresponding author: farnoosh.nemati@modares.ac.ir, ORCID: 0000-0002-7844-0108

Article history:

Received: 22/11/2025

Revised: 01/12/2025

Accepted: 14/12/2025

Abstract

The CRISPR/ Cas9 system has many applications in genome editing and allows for sensitive, rapid, cost-effective and multiplex detection of target nucleic acids. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR), are a part of the prokaryotic genome that contain short repeats of basic sequences. In bacteria, CRISPR is a type of adaptive immune system that enables them to detect and destroy viral DNA. This topic is being further investigated and genome editing with the CRISPR/ Cas9 system has found widespread use for the next generation of biosensors. Researchers have investigated a method for boosting the immune system based on CRISPR to attack tumors in the treatment of cancer. The aim of the present study is to investigate the genetic editing of the CRISPR/ Cas9 system to combat cancer. The results of numerous studies indicate that the gene editing method is safe and harmless and that this technology can be used in the treatment of cancer.

Keywords: CRISPR/ Cas9, Genome editing, Cancer, Genome.

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی

سال چهارم / شماره ۸ / پاییز ۱۴۰۴

صفحات ۸۵-۹۸

کاربرد سیستم ویرایش ژنی CRISPR/Cas9 در درمان بیماری‌ها با تمرکز بر سرطان

فرونش نعمتی^{۱*}، ژاله تحصیلی^۱

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آل‌طه، تهران.

۲. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: farnoosh.nemati@modares.ac.ir ، ORCID: 0000-0002-7844-0108

تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۴/۰۹/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

چکیده

سیستم کریسپر کس ۹ (CRISPR/ Cas9) در ویرایش ژنوم کاربردهای زیادی دارد و امکان شناسایی حساس، سریع، مقرون به صرفه و چندگانه اسیدهای نوکلئیک هدف را فراهم می‌کند. تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای یا به اختصار کریسپر، بخشی از ژنوم پروکاریوت هستند که دارای تناوب‌های کوتاه توالی‌های بنیادین هستند. کریسپر نوعی سیستم ایمنی تطابق‌پذیر در باکتری‌ها است که آن‌ها را قادر به کشف DNA ویروس و نابودی می‌کند. این موضوع در حال بررسی بیشتر است و ویرایش ژنوم با این سیستم برای نسل بعدی حسگرهای زیستی کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است. پژوهشگران، روش تقویت سیستم ایمنی مبتنی بر کریسپر را برای حمله به تومورها در درمان سرطان مورد بررسی قرار داده‌اند. نتایج بررسی‌های متعدد، بیانگر امن و بی‌خطر بودن روش ویرایش ژنی و امکان استفاده از این فناوری در درمان سرطان است. در همین راستا هدف مطالعه حاضر، بررسی ویرایش ژنتیکی سیستم

CRISPR/Cas9 در مقابله با بیماری‌ها به‌ویژه سرطان است.

کلمات کلیدی: CRISPR/ Cas9، ویرایش ژن، سرطان، ژنوم.

مقدمه

ویرایش ژن به مجموعه‌ای از فناوری‌ها می‌گویند که به دانشمندان توانایی تغییر در DNA را می‌دهد. در سال‌های اخیر دست یافتن به یک روش کارآمد در ویرایش هدفمند ژنوم سلول‌های زنده، یکی از مهم‌ترین هدف‌های زیست‌شناسی بوده است. تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) یا به اختصار کریسپر، بخشی از ژنوم پروکاریوت با تناوب‌های کوتاه توالی‌های بنیادین هستند. باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها توسط این سیستم از ژنوم خود در برابر حمله نوکلئیک اسید فاژها و پلاسمیدهای ادغام‌شونده محافظت می‌کنند. [۱] سامانه ویرایش ژن CRISPR/Cas9 به‌عنوان یکی از امیدبخش‌ترین ابزارهای درمانی در درمان بیماری‌های ژنتیکی و اکتسابی مطرح شده است. این فناوری امکان تغییر دقیق توالی‌های خاص DNA را فراهم می‌کند و بدین ترتیب می‌توان جهش‌های بیماری‌زا را اصلاح یا بیان ژن‌ها را تنظیم کرد. در سال‌های اخیر از سیستم کریسپر به‌دلیل توانایی مؤثر آن در ایجاد تغییر بر ژن‌های وراثتی به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در ویرایش ژنوم با اهداف درمانی استفاده می‌شود. [۳ و ۴] همچنین این تغییرات ژنتیکی در بسیاری از فعالیت‌های علمی، زیست فناوری، تأمین غذا و داروی انسان استفاده می‌شود. [۵]

بررسی عملکرد کریسپر و ویژگی‌های آن ابتدا توسط فرانسیسکو موهیکا در سال ۱۹۹۳ آغاز شد. با گذشت زمان، دانشمندان دانش بیشتری درباره آن کسب کردند و با تحقیقات متعدد در سراسر جهان، در سال ۲۰۰۵ به جزئیات قابل توجهی در عملکرد آن رسیدند. [۵]

ساختار و مکانیزم مولکولی کریسپر

ساختار سیستم CRISPR/Cas9 از پروتئین نوکلئاز (Cas 9) متصل به RNA

(CRISPR) تشکیل شده است. [۲] مولکول RNA موجود در این سیستم ردیفی از چند توالی تکراری کوتاه است که با اتصال به مولکول DNA خارجی، امکان تجزیه آن را توسط Cas9 فراهم می‌کند. (شکل ۱)

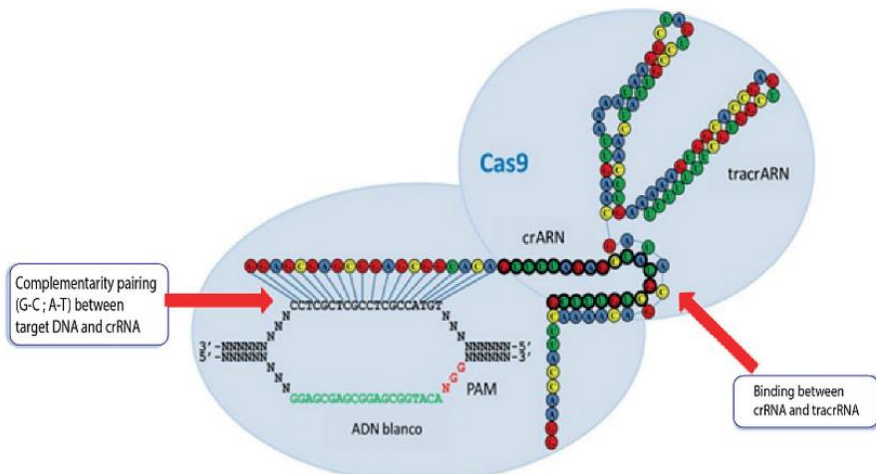
اولین مرحله تغییر هدفمند در عملکرد این سیستم، ایجاد یک شکست دو رشته‌ای (DBS^۱) در مکان مورد نظر ژنوم است که به وسیله آنزیم نوکلئاز انجام می‌شود. به طور کلی سه نوع سیستم کریسپر (I، II و III) در گروه زیادی از باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها شناسایی شده است. هر کدام از آنها شامل یک RNA غیرکدکننده حاوی توالی‌های تکرار مستقیم هستند که با توالی‌های کوتاه و متغیر از هم جدا می‌شوند و crRNA^۲ نامیده می‌شوند و با DNA هدف مکمل است. درون DNA هدف و در نزدیکی توالی متصل شونده به crRNA عموماً موتیف کوچکی وجود دارد که PAM^۳ نام دارد. اگر Cas9 یک PAM را در کنار ناحیه‌ای از DNA پیدا کند که با RNA راهنمای آن مطابقت دارد، فرایند برش DNA آغاز می‌شود. به طور کلی، پس از هر ۲۰ جفت باز نوکلئوتید RNA راهنما که با DNA هدف جفت می‌شود، Cas9 برش را ایجاد می‌کند. هنگامی که Cas9 به PAM متصل می‌شود دو رشته DNA را از هم باز می‌کند تا sgRNA^۴ به توالی DNA مکمل خود وصل شود. نوع II از شناخته‌شده‌ترین این سیستم‌ها بوده دارای نوکلئاز Cas9، crRNA، و یک RNA داربستی است.

۱. Double-strand break

۲. CRISPR RNA

۳. Protospacer Adjacent Motif

۴. Single guide RNA



شکل ۱. تصویر شماتیک سیستم کریسپر / کس ۹ (CRISPR/ Cas9) بر ژنوم هدف [۳۰]. کریسپر در باکتری‌ها قسمتی از DNA باکتری را برش می‌دهد و در تهاجم بعدی به باکتری برای شناسایی عامل بیماری‌زا کمک می‌کند. این سیستم را می‌توان با بهینه‌کردن کدهای Cas9 براساس کدهای ژنتیکی پستانداران و نیز فراهم‌کردن اجزای RNA آن در سلول‌های انسان نیز مورد استفاده قرار داد. [۳ و ۶] دانشمندان از این سیستم برای سلول‌های دیگر جانوران مانند موش و انسان استفاده کرده‌اند. [۷] هدف دانشمندان این است که با کمک این سیستم در نهایت بتوانند با ویرایش برخی ژن‌ها، بدن بیمار را در مقابله با سرطان آماده کنند. به عبارت دیگر این روش را می‌توان نوعی «ژن درمانی» در نظر گرفت. [۷]

کاربرد سیستم کریسپر در ایمنی و درمان بیماری‌ها

سیستم کریسپر در مطالعه و درمان بیماری‌های مختلف عفونی نقش قابل توجهی ایفا کرده است. این روش امکان حذف یا غیرفعال‌سازی ژن‌های ویروسی را فراهم می‌کند و از این طریق می‌تواند به حذف عفونت از سلول‌های آلوده منجر شود. مطالعات نشان داده که استفاده از کریسپر در بیماری‌های ویروسی مختلف، موجب کاهش بار ویروسی یا حذف کامل ژنوم ویروس از سلول میزبان شده است. در بیماری عفونی ایدز، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) با ورود به گلبول‌های سفید خون انسان و تغییر ژنوم آن‌ها،

کپی‌هایی از خود می‌سازد تا سیستم ایمنی فرد را آلوده کند و آن‌ها را در برابر سایر عفونت‌ها آسیب‌پذیر سازد. در این راستا استفاده از سیستم CRISPR برای ایجاد برش در DNA مشتق شده از ویروس و نیز مهندسی ژنوم بیمار به‌گونه‌ای که مانع ورود ویروس به سلول‌ها شود، در دست بررسی است. [۱۱] این فناوری در طراحی آزمایش‌های تشخیصی سریع و دقیق شناسایی ویروس‌هایی نظیر SARS-CoV-2 در پاندمی کووید نیز کاربرد داشته است. [۱۱]

همچنین پژوهشگران امیدوارند که از سیستم درمانی ویرایش ژنی کریسپر برای درمان برخی از بیماری‌های ژنتیکی استفاده کنند. این بیماری‌ها زندگی بیماران را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ باین‌حال درمان‌های موجود به‌صورت مداوم و پرهزینه هستند. در برخی بررسی‌ها، این سیستم در درمان کم‌خونی سلول‌های داسی‌شکل و تالاسمی مورد آزمایش قرار گرفته است. (۱۳، ۱۴) کاسجوی (Casgevy) از CRISPR/Cas9 برای اصلاح ژن‌های معیوب استفاده می‌کند. این روش درمان به بیماران کمک می‌کند تا تولید هموگلوبین جنینی (HbF) را افزایش دهند و علائم بیماری را کاهش دهند؛ [۱۸] باین‌حال، تأثیرات بلندمدت و میزان ایمنی‌زایی این درمان‌ها نیازمند پیگیری و بررسی تغییرات طولانی‌مدت در سلامت و ژنوم بیمار است. علاوه بر آن، به‌کارگیری فناوری نوین ویرایش ژن کریسپر برای درمان بیماری‌های خونی، روشی پرهزینه، اما مؤثر است. [۲۰]

کاربرد سیستم کریسپر در درمان سرطان و ایمنی درمانی

سرطان‌ها اغلب حاصل جهش‌های پرشمار و متنوعی هستند که به رشد بیش از حد سلول‌ها و بروز فنوتیپ‌های بدخیم منجر می‌شود. [۷] سیستم کریسپر به‌عنوان یک ابزار قدرتمند، توانایی اصلاح این جهش‌ها و درمان تقریبی برخی سرطان‌های حاصل از آن‌ها را دارد. کریسپر می‌تواند برای درمان سرطان‌های نادر و ژنتیکی که به درمان‌های معمول پاسخ نمی‌دهند، استفاده شود. این فناوری توانایی اصلاح جهش‌های خاص را در سرطان‌های کمتر شناخته شده دارد و به پیشرفت درمان‌های شخصی‌سازی شده کمک زیادی می‌کند. بیماری سرطان نخستین عامل مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی

در جهان است که بار اقتصادی و اجتماعی سنگینی را به جوامع تحمیل می‌کند. نخستین آزمایش ویرایش ژن با روش کریسپر در انسان، در ۲۰۱۶ برای درمان سرطان ریه انجام شد. در این آزمایش سلول‌های ایمنی فرد مبتلا به سرطان ریه را خارج و ژن عامل ایجاد پروتئین PD-1 (Programmed cell death protein 1) را غیرفعال کردند. پروتئین PD-1 عملکرد سلول‌های ایمنی را کند می‌کند و به سلول‌های سرطانی اجازه انتشار می‌دهد. پس از ویرایش سلول‌ها آن‌ها را کشت و دوباره به بیمار تزریق کردند. [۹] در سال ۲۰۱۴ نیز مطالعه وسیعی روی سرطان خون توسط ونگ و همکاران با استفاده از سیستم کریسپر انجام شد. [۱۰] پژوهشگران با این روش می‌توانند مدل‌های جدیدی از سرطان در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد کنند که به درک بهتر از روند توسعه بیماری و بررسی درمان‌های جدید کمک می‌کند. به نظر می‌رسد این فناوری به‌طور گسترده‌ای صنعت زیست فناوری و درمان را تحت تأثیر خود قرار بدهد. با وجود پیشرفت‌های بسیار در این زمینه، هنوز تحقیقات بیشتر و آزمایش‌های بالینی برای ارزیابی کامل ایمنی و اثربخشی این روش‌ها مورد نیاز است.

روش‌های درمانی متعددی از جمله ایمنی درمانی، در مهار سرطان به‌کار گرفته می‌شود و پژوهش‌های زیادی در این زمینه در حال انجام است. [۸] ایمنی درمانی با استفاده از سیستم ایمنی، پس از جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی از جمله بهترین روش‌های مکمل در درمان سرطان است.

در این روش به سلول‌های بدخیم حمله می‌شود و روی سلول‌های سالم بدن تأثیر چندانی ندارد و بنابراین اختصاصی عمل می‌کند. ایمنی‌درمانی سرطان در صورت استفاده مستقیم اجزای سیستم ایمنی و ایجاد پاسخ ایمنی فعال، ایمنی‌درمانی فعال و در صورت تحریک غیرمستقیم و استفاده از محصولات ایمنی مانند آنتی‌بادی مونوکلونال، ایمنی‌درمانی غیرفعال خوانده می‌شود. [۹] پژوهشگران در بررسی‌ای که با هدف اصلاح سلول‌های ایمنی با روش کریسپر در سه بیمار مبتلا به سرطان و مبارزه بهتر با تومورها صورت گرفت، نشان دادند که سلول‌های درمان شده، برای مدت بیشتری در بدن باقی می‌مانند و عوارض جانبی خطرناکی نیز ندارند. آزمایش‌هایی که روی حیوانات صورت گرفته‌اند، نتایج امیدوارکننده‌ای را برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان دهانه

رحم، دیستروفی ماهیچه‌ای و ایدز نشان داده‌اند. [۱۰]

در تحقیقات مشخص شده که سرطان‌های در حال رشد دارای لنفوسیت‌های نفوذیافته درون تومور^۱ (TIL) هستند. این سلول‌ها در شرایط *In vivo* به دلیل توانایی سلول‌های سرطانی در فرار از تشخیص و حذف توسط سیستم ایمنی بدن، در حذف تومور بی‌اثر هستند. [۱۰]

اما در روش ایمنی‌درمانی با واسطه لنفوسیت‌های T، لنفوسیت‌های نفوذی به درون توده تومورها اهمیت زیادی دارند و در نخستین ایمنی‌درمانی‌های انجام شده آن‌ها از توده توموری خارج و در محیط آزمایشگاه فعال و به بیمار تزریق شدند. [۱۱] فعال‌سازی اختصاصی سیستم ایمنی به‌ویژه لنفوسیت‌های T، یکی از اهداف اساسی در حوزه ایمنی‌درمانی سرطان است.

دانشمندان برای اولین بار ایده مهندسی سلول‌های T بدن را برای مبارزه با سرطان در سال‌های ۱۹۸۰ مطرح کردند. این سلول‌ها که بخشی از سیستم ایمنی هستند، معمولاً ویروس‌ها و عفونت‌ها را شناسایی می‌کنند، اما در برابر سرطان ضعیف عمل می‌کنند. ایده اصلی این بود که گیرنده‌های مصنوعی CAR^2 روی این سلول‌ها نصب شود تا مستقیم به آنتی‌ژن‌های سرطانی بچسبند. فناوری CAR^3 روشی است که سلول‌های T را با ژن‌های کایمیریک دست‌کاری کردند؛ به این صورت که نواحی متغیر رشته‌های آلفا و بتای سلول‌های T را با VH (ناحیه متغیر آنتی‌بادی از زنجیره سنگین) و VL (ناحیه متغیر آنتی‌بادی از زنجیره سبک) در یک آنتی‌بادی مونوکلونال جایگزین کردند. در درمان به‌واسطه گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمیریک سلول‌های T، می‌توان سلول‌های T کشنده را به سلول‌های بیان‌کننده آنتی‌بادی تغییر داد. با این روش می‌توان لوسمی و لنفوم را در موش درمان کرد. [۱۲]

در یک مطالعه، با استفاده از کریسپر برای حذف سه ژن در توانایی سلول‌ها برای مبارزه با سرطان تداخل ایجاد کردند. [۱۵] پژوهشگران در مرحله بعد آزمایش‌های خود،

۱. Tumor Infiltrating Lymphocytes

۲. Chimeric Antigen Receptor

۳. CAR T-cell Therapy

از ویروسی استفاده کردند تا سلول‌های T را با پوششی، مجهز کنند تا به پروتئین NY-ESO-1^۱ حمله کنند. این پروتئین روی سلول‌های سرطانی یافت شده و به‌ندرت روی بافت طبیعی دیده می‌شود؛ [۱۵] بنابراین NY-ESO-1 به‌عنوان یک هدف امیدبخش برای ایمنی‌درمانی سرطان مطرح شده است. [۱۷]

ژن پیوندی (Fugen gen؛ ژنی که از آمیختگی دو ژن جداگانه پدید آمده است) در میان تومورهای پروستات، پستان، ریه و مغز یافت می‌شود و تنها در سلول‌های توموری وجود دارد. بررسی ژن پیوندی به یکی از موضوعات مورد علاقه دانشمندان برای مطالعه تبدیل شده است. با استفاده کریسپر، محققان می‌توانند توالی‌های خاصی از ژنوم را مورد هدف قرار دهند و قطعات DNA را بریده و کپی کنند و ژنوم را به روشی کنترل‌شده اصلاح کنند. پژوهشگران در مطالعه انجام شده روی موش‌های مبتلا به سارکوم یوئینگ و سرطان خون میلوئیدی موفق شدند سلول‌های تومور را با بریدن ژن‌های پیوندی ایجادکننده تومور از بین ببرند. [۱۷] جهش‌ها یا کمبودها در ژن P53، تقریباً در هر نوع سرطان یافت می‌شود و این ژن در حال حاضر اغلب به‌عنوان ژن سرکوب‌کننده تومور شناخته می‌شود. ویژگی بارز مربوط به این جهش‌ها این است که با پراکندگی زیاد روی بیش از ۲۰۰ کدون مختلف روی می‌دهد. P53 دارای مکانیسم‌های ضدسرطانی زیادی است و در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، در پایداری ژنوم و جلوگیری از فعالیت‌های رگزایی نقش دارد. تحقیقات جدید نشان می‌دهد در طی زمانی که دانشمندان در حال توسعه درمان کریسپر هستند، ممکن است به‌طور اتفاقی، سلول‌هایی را به وجود بیاورند که دارای پروتئین P53 غیرفعال هستند. این بدان معنی است که این فرایند در نهایت می‌تواند سلول‌های بیمار را در طولانی مدت برای تبدیل شدن به سلول‌های سرطانی، آسیب‌پذیرتر کند. [۲۳] مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های ویرایش شده با روش کریسپر، قبل از استفاده بالینی باید مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند تا اطمینان حاصل شود که مسیرهای تولید پروتئین p53 متلاشی نخواهند شد. [۲۴] محققان برای اطمینان از عدم وجود هیچ عارضه جانبی که می‌تواند ناشی از کریسپر باشد، باید مدت

۱. New York esophageal squamous cell carcinoma 1

طولانی‌تری بیماران را تحت نظر قرار دهند. با این حال، بزرگ‌ترین مسئله هزینه درمان است. [۲۳] متأسفانه سیستم کریسپر همیشه مطابق انتظار دانشمندان کار نمی‌کند. گاهی اوقات، استفاده از ابزار برش ژن موجب عوارض ناخواسته می‌شود و ممکن است جهش‌های ایجاد شده موجب شرایطی مانند تومور شود. [۲۴] علاوه بر این، انتقال مؤثر کمپلکس CRISPR/ Cas9 به سلول‌ها و بافت‌های هدف از نظر ایمنی و کارایی هنوز چالش‌برانگیز است. پاسخ‌های ایمنی احتمالی بدن به پروتئین Cas9 نیز ممکن است باعث التهاب یا حذف سلول‌های ویرایش شده شود. از سوی دیگر، نگرانی‌های اخلاقی و اجتماعی در مورد ویرایش ژنوم انسان، به‌ویژه در سلول‌های زایا، مانع از استفاده گسترده بالینی این فناوری شده است. همچنین خطرات ناشناخته در ارتباط با پایداری بلندمدت و پیامدهای ژنتیکی ناشی از ویرایش ژن، نیاز به بررسی‌های عمیق‌تر و توسعه فناوری‌های دقیق‌تر را ضروری می‌سازد. [۲۵ و ۲۶]

بحث و نتیجه‌گیری

کریسپر به دانشمندان اجازه می‌دهد که روش درمانی فوق‌العاده‌ای برای ویرایش دقیق DNA داشته باشند. در بیشتر موارد، این روش، امیدوارکننده، امن و مؤثر است. پزشکان برای نخستین بار در ایالات متحده از ابزار ویرایش ژنی کریسپر برای کمک به بیماران سرطانی استفاده کردند. این آزمایش‌ها نیازمند بررسی‌های بیشتر و تحقیقات تکمیلی است، اما به اعتقاد محققان این نتایج، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای را پیش روی قرار داده است و نیازمند تکرار در بیماران بیشتر و همچنین استفاده از روش‌های کمکی دیگر است. این نخستین بار نیست که از روش‌های ویرایش ژنی برای درمان سرطان استفاده می‌شود، اما در این میان، فناوری کریسپر توانایی بالا و مشکلات کمتر نسبت به روش‌های قبلی دارد. [۲۷-۲۹]

منابع

1. Gretchev, A. (2025). "Gene Editing". *Precision Healthcare: Genomics-Informed Nursing*, 13.2, 123-235.
2. Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. (2014). "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering". *Cell*, 157(6), 1262-78.
3. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F. (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system". *Nature protocols*, 8, 2281–2308.
4. Stadtmauer, E.A., Cohen, A.D., Weber, K., Lacey, S.F., Gonzalez, V.E., Melenhorst, J.J., et al. (2019). "First-in-human assessment of feasibility and safety of multiplexed genetic engineering of autologous T cells expressing NY-ESO-1 TCR and CRISPR/Cas9 gene edited to eliminate endogenous TCR and PD-1 (NYCE T cells) in advanced multiple myeloma (MM) and sarcoma". *Blood*, 134: 48.
5. Stadtmauer, E.A., Fraietta, J.A., Davis, M.M., et al. (2020). "CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer". *Science*, 367(6481): eaba7365.
6. Dhodapkar, M.V., Borrello, I., Cohen, A.D., Stadtmauer, E.A. (2017). "Hematologic Malignancies: plasma cell disorders". *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 37: 561-8.
7. Liao, H-K., Hatanaka, F., Araoka, T., Reddy, P., Wu, M-Z., Sui, Y., et al. (2017). "In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation". *Cell*, 171(7):1495-507.
8. Redman, M., King, A., Watson, C., King, D. (2016). "What is CRISPR/Cas9? Arch Dis Child Educ Pract Ed". 101(4):213-215.
9. Castillo, A. (2016). "Gene editing using CRISPR-Cas9 for the treatment of lung cancer". *Colomb Med*, 30; 47(4):178-180.
10. Wang, J. & Quake, S.R. (2016). "RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (111): 13157–13162.
11. Suzuki, K., Yu, C., Qu, J., Li, M., Yao, X., Yuan, T., et al. (2014). "Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones". *Cell stem cell*, 15(1):31-6.
12. Drake, C.G., Jaffee, E., Pardoll, D.M. (2006). "Mechanisms of immune evasion by tumors". *Adv Immunol*, 90:51-81.
13. Suzuki, K., Yu, C., Qu, J., Li, M., Yao, X., Yuan, T., et al. (2014). "Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones". *Cell stem cell*, 15(1):31-6.
14. Cai, B., Chang, S., Tian, Y., Zhen, S. (2023). CRISPR/Cas9 for hepatitis B virus infection treatment, *Immun Inflamm Dis*, 11(5): 866.
15. Li, R., Zhong, C., Yu, Y., Liu, H., Sakurai, M., Yu, L., et al. (2019). "Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures". *Cell*,

- 179(3):687-702.
16. Ren, X., Yang, Z., Xu, J., Sun, J., Mao, D., Hu, Y., et al. (2014). "Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*". *Cell reports*, 9(3):1151-62.
 17. Wang, J., Quake, S.R. (2014). "RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(36):13157-62.
 18. Chen, K., Husain, S., Marathe, A., Haq, M., Sciences, H. (2018). *Molecular Genetics of Cancer*, 2(4):199-208.
 18. Sharabi, A., Ying, D., Thomas, R., Klatzmann, D., George, C. (2018). "Regulatory T cells in the treatment of disease". *Nature Reviews Drug Discovery*, 17.
 19. Schwank, G., Koo, B-K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., et al. (2013). "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients". *Cell stem cell*, 13(6):653-8.
 20. Thomas, R., Al-Khadairi, G., Roelands, J., Hendrickx, W., Dermime, S., Bedognetti, D., Decock, J. (2018). "NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives". *Front Immunol*, (1);9:947. doi: 10.3389/fimmu.2018.00947. PMID: 29770138; PMCID: PMC5941317.
 21. Singh, A., Irfan, H., Fatima, E., Nazir, Z., Verma, A., Akilimali, A. (2024). "Revolutionary breakthrough: FDA approves CASGEVY, the first CRISPR/Cas9 gene therapy for sickle cell disease". *Ann Med Surg (Lond)*, (15);86:4555-4559. doi: 10.1097/MS9.0000000000002146. PMID: 39118728; PMCID: PMC11305803.
 22. Shalapour, S., Karin, M. (2015). "Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil", (125) 9:3347-55.
 23. Schwank, G., Koo, B-K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., et al. (2013). "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients". *Cell stem cell*, 13(6):653-8.
 24. Sweeney, J. (2000). "CRISPR: A potential paradigm shift in the fight against cancer". *Pharmacy Today*, 26(2):6-7.
 25. Hahn, W.C., (2019). "A CRISPR way to identify cancer targets". *New England Journal of Medicine*, 380(25):2475-7.
 26. Tzelepis, K. (2016). "Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, et al. A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia". *Cell reports*, 17(4):1193-205.
 27. Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M.D., Chen, Y-S, Domm, J., Eustace, B.K., et al. (2020). "CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia". *New England Journal of Medicine*.
 28. Beyret, E., Liao, H-K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., et al. (2019). "Single-dose CRISPR-Cas9 therapy extends lifespan of mice with

- Hutchinson–Gilford progeria syndrome". *Nature medicine*, 25(3):419-22.
29. Ausseil, C., Cathomen, T. & Fuster-García, C. (2025). "The hidden risks of CRISPR/Cas: structural variations and genome integrity". *Nat Commun*, (16), 7208. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-62606-z> .