



Universidad  
de La Laguna

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

# **¿SE PUEDE APLICAR EL SISTEMA CRISPR-Cas9 EN INMUNOTERAPIA?**

DANIEL QUINTANA MULET

**Curso 2018/2019**

**Tutor: Enrique Martínez Carretero**



## Índice

	<b><u>Páginas</u></b>
<b>ABSTRACT/RESUMEN</b> .....	4
<b>1- OBJETIVOS</b> .....	5
<b>2- ORIGEN DEL SISTEMA CRISPR-CAS9</b> .....	5-6
<b>3- COMPOSICION Y FUNCIONAMIENTO</b> .....	7-9
<b>4- EVOLUCION COMO HERRAMIENTA DE EDICION GENETICA</b> .....	9-11
<b>5- APLICACIÓN CLINICA</b> .....	11-14
<b>6- LIMITACIONES</b> .....	15
<b>7- APLICACIÓN EN VIH</b> .....	15-21
<b>8- CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>9- BIBLIOGRAFIA</b> .....	22

## **ABSTRACT**

The called *Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* technology and its associated genes, known by the acronym CRISPR-Cas9, is a genetic editing tool developed over the last decade due to its high potential use on medical research. For a long time, it was simply conceived as a repeating element within bacterial genome, responsible for granting immunity to its carrier against external genetic material invasion. However, progress on genetic engineering has given CRISPR-Cas9 the ability to become an editable technology of great interest for its medical approach. One of its applications resides in immunotherapy, or biological therapy. These are aimed at stimulating immune system in order to fight diseases such as AIDS or cancer, in which immunological defences are weakened. There are various techniques, such as adoptive cell transfer or gene knockout, in which CRISPR-Cas9 is especially useful.

General applications of CRISPR-Cas9 in the immunotherapeutic approach will be briefly described and its mechanism of action against HIV will be developed.

## **RESUMEN**

La tecnología denominada *Cluster Regulated Interspaced Short Palindromic Repeats* y sus genes asociados, conocida por las siglas CRISPR-Cas9, es una herramienta de edición genética desarrollada durante la última década por su alto potencial de uso en la práctica médica. Durante mucho tiempo CRISPR-Cas9 era considerado simplemente como un elemento de repetición del genoma bacteriano, encargado de conceder inmunidad a su portador frente a la invasión de material genético externo. Sin embargo, los avances logrados han convertido a CRISPR-Cas9 en una tecnología programable para su aplicación en el campo sanitario. Una de las posibles aplicaciones de esta herramienta se encuentra en la inmunoterapia, o terapia biológica. Éstas están orientadas a la estimulación del sistema inmune, con el fin combatir enfermedades en las que las defensas inmunológicas se ven comprometidas, como el SIDA o el cáncer. En estas enfermedades, la herramienta CRISPR-Cas9 es especialmente útil a través de técnicas como *knockout* de oncogenes y terapias de .transferencia celular adoptiva.

Se describirá brevemente las posibles aplicaciones generales del CRISPR-Cas9 en el abordaje inmunoterapéutico y se desarrollará su mecanismo de acción ante la infección por el virus VIH.

## 1. OBJETIVOS

- Explicar el funcionamiento de CRISPR-Cas9 y su evolución como herramienta de edición genética.
- Valorar su potencial para ser aplicado en terapias biológicas
- Explorar su mecanismo de acción ante la infección por VIH

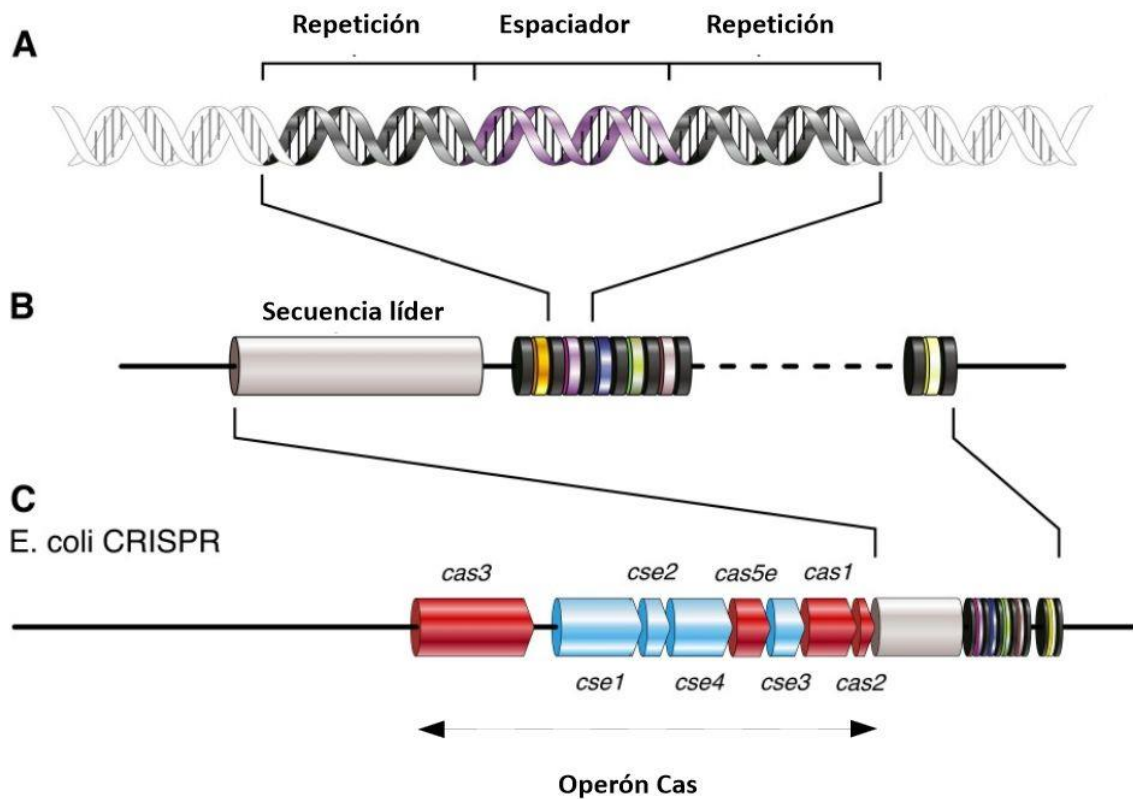
## 2. ORIGEN DEL SISTEMA CRISPR-CAS9

Los primeros conocimientos registrados respecto al sistema CRISPR-Cas9 aparecen en 1987, de la mano de Nakata y colaboradores durante el estudio del genoma de *Escherichia coli*. En dicho estudio se describe la presencia de una serie de repeticiones palindrómicas, de aproximadamente 29 nucleótidos, separadas por fragmentos de 32 pares de base (bp). Este hallazgo llamó la atención, pero no se le atribuyó una relevancia biológica clara.

Ese mismo año, Francisco J. Mojica estudiaba los mecanismos de algunas bacterias y arqueas para adaptarse a los cambios de salinidad del medio y cómo influye en la expresión de sus genes. Se descubrió que algunos de estos microorganismos albergaban una zona del genoma en la que, como en los estudios en *E.coli*, se observaban secuencias repetidas de forma palindrómica, separadas entre sí por fragmentos muy parecidos a los de algunos virus y plásmidos. En un principio se pensó que estas secuencias no eran codificantes y que no desempeñarían ninguna función aparente.

A partir de los años 90, el avance de las técnicas de secuenciación permitió la identificación de nuevas unidades de repetición en otros genomas microbianos no descritos, y completar las secuencias de otros ya conocidos, lo cuál evidenció la amplia distribución de estas repeticiones en toda la diversidad microbiana, existiendo en bacterias en un 40% y en arqueas en un 90%. Esto empezaba a suscitar dudas sobre la relevancia biológica de estas secuencias. En el año 2002, Mojica y colaboradores acuñan el término **CRISPR**, del inglés *Cluster Regulated Interspaced Short Palindromic Repeats*, definiendo los diferentes elementos que componen el locus CRISPR. Observaron que los microorganismos portadores de estas secuencias muestran una serie de genes conservados próximos a las mismas, a los que se les denominó genes

asociados a CRISPR o genes *Cas* (*CRISPR-associated*). Éstos son fundamentales para la expresión de las enzimas del sistema, y estaban ausentes en microorganismos CRISPR negativos y organismos eucariotas. Esto sugirió una fuerte relación entre los genes *cas* y CRISPR.



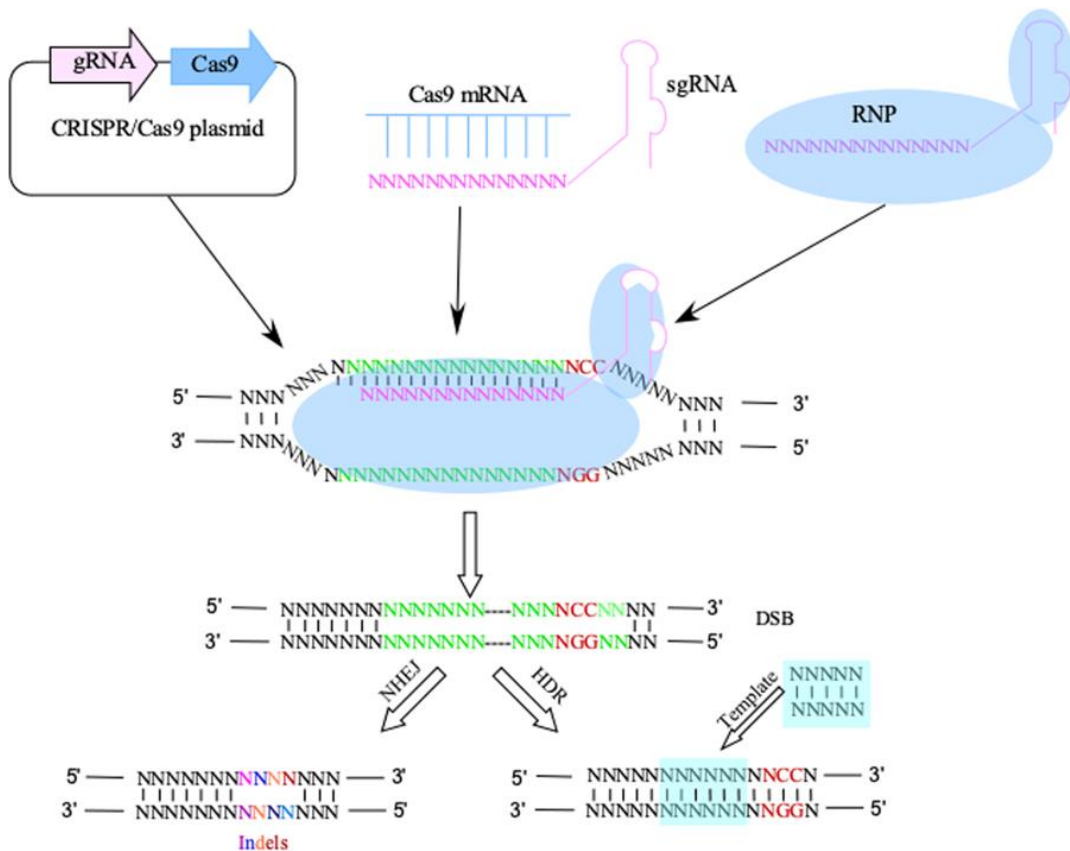
**Figura 1.** Repeticiones palindrómicas del locus CRISPR acompañada de los genes *Cas* (Karginov FV y Hannon GJ. *Mol Cell*, 2010).

En 2005, Bolotín y colaboradores descubren que los fragmentos espaciadores del sistema se correspondían con material genético de origen extracromosómico. Se demostró la homología entre los espaciadores y el ADN de algunos fagos y plásmidos bacterianos. Asimismo, se comprobó que tras el enfrentamiento de una bacteria CRISPR positiva a un fago existe una alta probabilidad de que el microorganismo integre en su genoma fragmentos del material genético del fago, otorgándole inmunidad frente a dicho agente invasor. Estas observaciones pusieron de manifiesto el papel fundamental del sistema CRISPR-Cas9 al funcionar como un mecanismo adaptativo de defensa inmunológico bacteriano.

### 3. COMPOSICION Y FUNCIONAMIENTO

Existen tres tipos de sistema CRISPR-Cas: tipo I, II y III. La presente revisión se centrará en el tipo II por ser el más estudiado y aplicado como herramienta de edición genética.

El sistema CRISPR-Cas9 consta de dos partes: la endonucleasa Cas9 y una cadena de ARN guía monocatenario (*sgRNA*). El *sgRNA* dirige a la endonucleasa para realizar una escisión específica de las dos hebras de ADN, denominada **Double Strand Break (DSB)**.

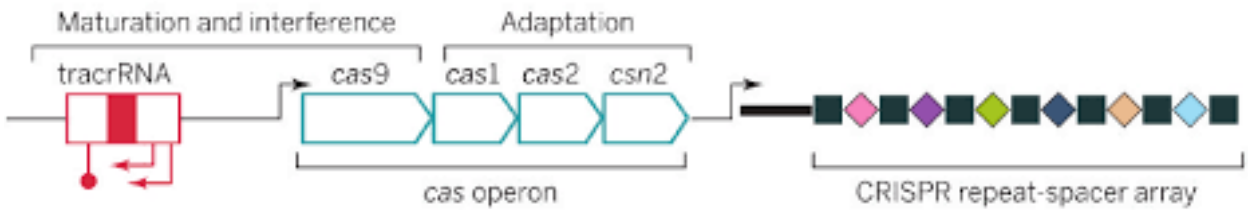


**Figura 2.** Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9 (Tian et al, 2019).

El corte se produce a 3 pares de bases corriente arriba de una secuencia “**NGG**”, denominada *Protospacer Adjacent Motif (PAM)*, que es adyacente al elemento espaciador. Una vez creado realizado el corte entran en juego los mecanismos de reparación celular.

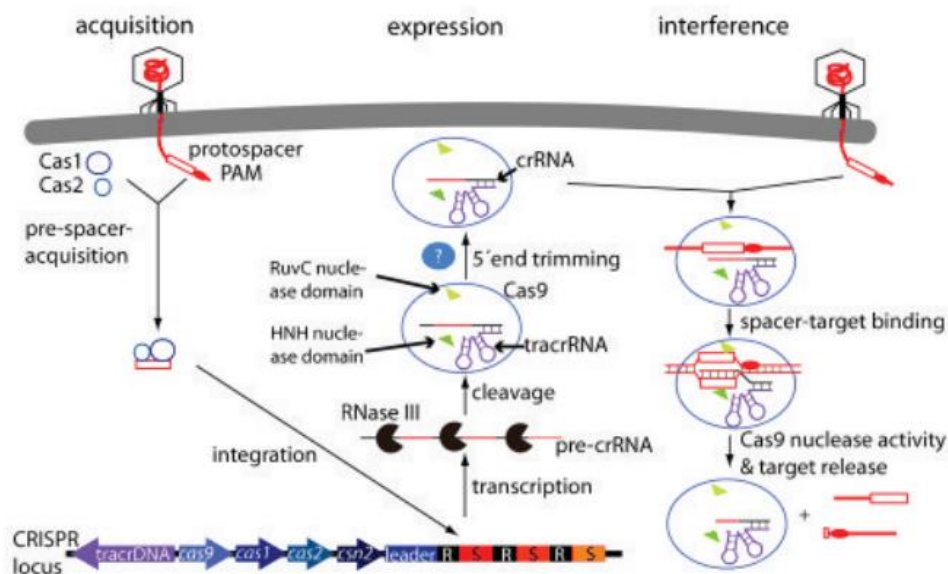
Respecto al locus, CRISPR-Cas presenta dos componentes principales: la región de secuencias CRISPR y el operón de genes *Cas*.

### Genomic CRISPR locus



**Figura 3.** Composición del locus CRISPR (Charpentier & Doudna, 2014).

La especificidad de las endonucleasas por las regiones del ADN exógeno depende de las secuencias PAM presentes material genético externo. El espaciador en el locus bacteriano CRISPR no contendrá una secuencia PAM y no será escindido por la endonucleasa. En el locus CRISPR foráneo sí se observa esta secuencia y eso determinará su corte. Una vez escindidos, los fragmentos protoespaciadores son incorporados al genoma bacteriano como elementos espaciadores, completándose la primera fase del mecanismo de defensa denominada **adaptación**. Tras incorporar este material genético a su genoma, la bacteria adquiere inmunidad frente a posibles invasiones subsiguientes del mismo agente externo.

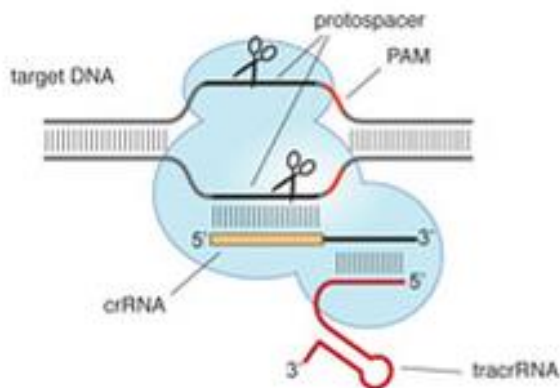


**Figura 4.** Etapas del funcionamiento del sistema CRISPR en procariontes (Kirchner & Schneider, 2015).



En la segunda etapa se produce la **expresión** de CRISPR, obteniéndose un fragmento transcripcional de ARN (*pre-crRNA*). Este fragmento es procesado por la RNAsaIII, de forma que se obtienen pequeños fragmentos de ARN (*cr-RNA*) que servirán de anclaje para Cas9. El *cr-RNA* maduro se une a una secuencia activadora (*tra-crRNA*) para formar un complejo *tracrRNA:crRNA*. Las secuencias PAM son complementarias con las secuencias de *crRNA*. Esto guiará a Cas9 a una posición específica del genoma externo para realizar la escisión correspondiente, anulando la acción del agente invasor en una última etapa denominada **interferencia**, que comienza con un nuevo contacto con el mismo organismo.

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex

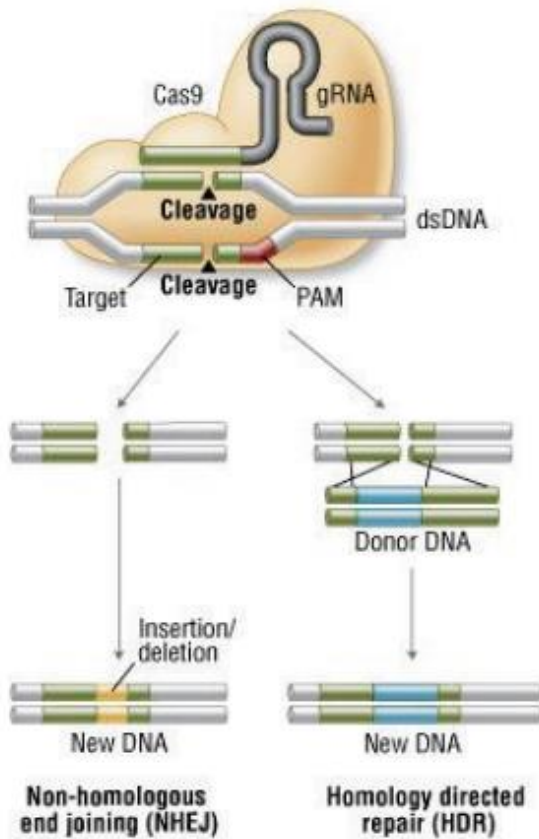


**Figura 5.** Reconocimiento y procesamiento de ADN por el complejo *tracrRNA:crRNA* (M. Jinek et al, 2012).

#### 4. EVOLUCION COMO HERRAMIENTA DE EDICION GENETICA

El salto de CRISPR-Cas9 para ser concebido como herramienta programable de edición genética parte de su capacidad para realizar los DSBs.

Tras producirse este tipo de escisiones se ponen en marcha los patrones de reparación celular. El patrón *NHEJ* funciona por recombinación no homóloga de nucleótidos, que produce mutaciones por inserción o deleción (*INDEL*), anulando la expresión del gen. El patrón *HDR* introduce nucleótidos por recombinación homóloga, y solo entra en juego ante la presencia de un ADN externo. De esta forma, conociéndose la secuencia del mismo, se puede estudiar la especificidad requerida para realizar un corte en una posición determinada.

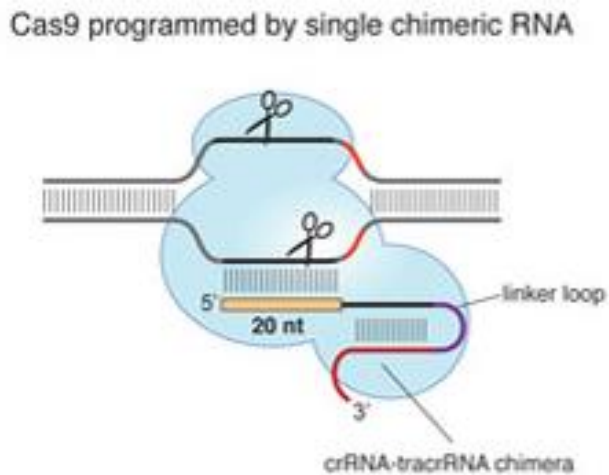


**Figura 7.** Mecanismos de reparación celular NHEJ y HDR (Charpentier & Doudna, 2014).

A principios del siglo veintiuno, las estrategias para conseguir este tipo de escisiones se orientaban al desarrollo de enzimas con actividad ADN-lítica. Se descubrió que cada tipo de endonucleasa requiere una secuencia específica de reconocimiento, lo cuál suponía una baja probabilidad de trabajar en un gen específico. Así pues, se estudió la fusión quimérica de estas enzimas con ciertos elementos, como los dedos de Zinc o las proteínas *TALE*, para buscar una mayor especificidad. Sin embargo, estas herramientas no ganaban mucha aceptación y existían varias limitaciones para desarrollarlas a través de la ingeniería genética.

En 2012, Charpentier y Doudna llevaron a cabo un estudio que demostró la posibilidad de programar la especificidad de Cas9 a través de un fragmento guía de ARN quimérico (*sgRNA*), emulando la acción de crRNA:tracrRNA de una forma más eficiente y segura que las tecnologías habituales. Esto abrió la posibilidad de programar secuencias específicas para trabajar en genes concretos, lo cuál supuso una revolución y colocó a CRISPR-Cas como la técnica de elección para la edición genética.

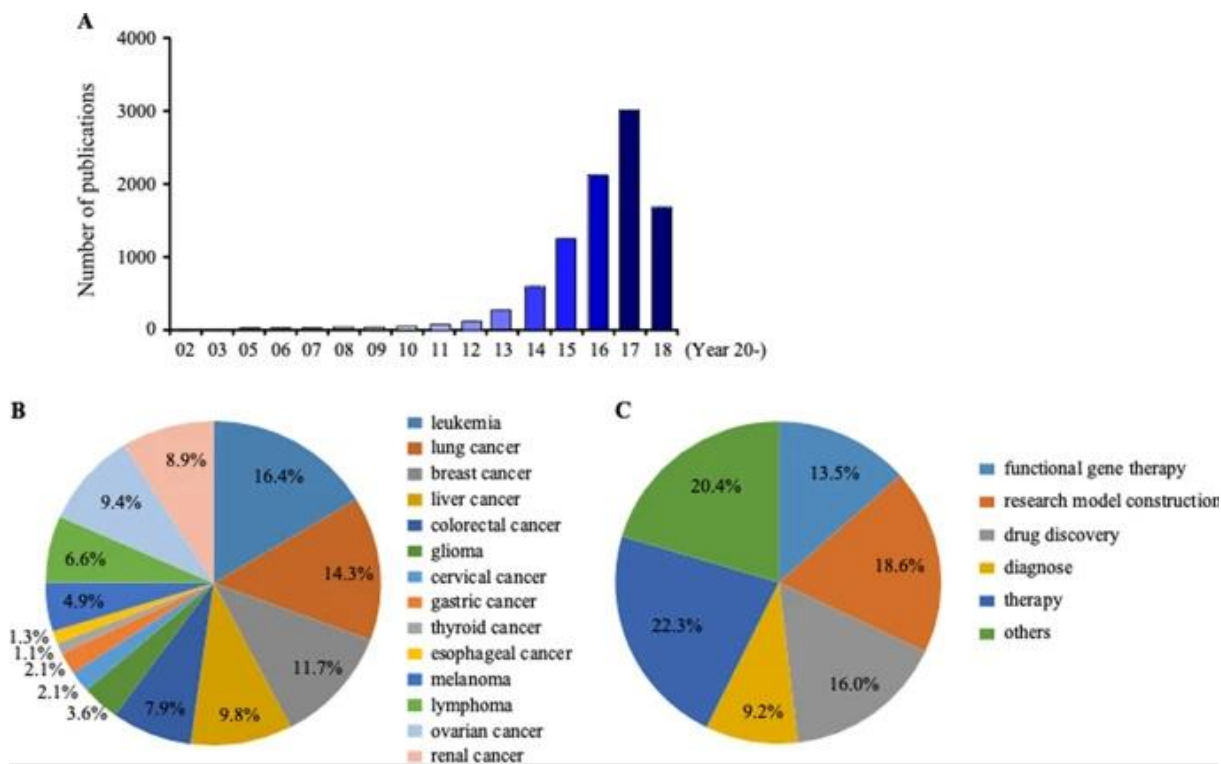
**Figura 8.** Reconocimiento y procesamiento de ADN a través de ARN quimérico (M. Jinek et al, 2012).



## 5. APLICACIÓN CLINICA

Existen varias enfermedades en las que el uso de CRISPR-Cas9 puede resultar efectivo. Si bien la tecnología es aplicada mayoritariamente para el tratamiento de enfermedades monogénicas, se ha investigado su capacidad para el abordaje terapéutico de enfermedades dependientes de múltiples alteraciones genéticas. Así pues, existen diferentes líneas de investigación relacionadas con esta herramienta para la erradicación de enfermedades como el SIDA o el cáncer, de elevada carga genética y gran prevalencia mundial.

En la investigación contra el cáncer se encuentran diversas formas de aplicar esta tecnología. Algunas de ellas son el establecimiento de modelos cancerígenos, estudios funcionales de genes, estudios de resistencia a fármacos antitumorales, validación de dianas o diagnóstico genético. En este sentido, las publicaciones referidas a la aplicación de CRISPR-Cas9 en esta enfermedad han ganado popularidad a lo largo de los años, especialmente para leucemia y cáncer de pulmón.



**Figura 9. A.** Publicaciones desde 2002 a 2018 en PubMed sobre la aplicación del CRISPR-Cas 9 en cáncer. **B.** Tipos de cáncer susceptibles de aplicar CRISPR-Cas9. **C.** Diferentes aproximaciones de la aplicación de CRISPR-Cas9 en cáncer (Tian et al, 2019).

Una de las aplicaciones de mayor interés de CRISPR-Cas9 consiste en el bloqueo o *knockout* de genes. La inactivación de los genes se consigue a través de la inducción de mutaciones en sus secuencias, alterándose el marco de lectura e interrumpiéndose los procesos de transcripción y traducción. Para conseguirlo es necesaria la formación de un vector que dirija y controle la expresión del gen. Una vez construido el vector, será incorporado a un cultivo de células embrionarias. El plásmido contenido reconocerá la secuencia de interés en las células, produciéndose un proceso de recombinación en el que el vector incorpora el gen endógeno, y el locus genómico de la célula huésped incorpora el gen contenido en el plásmido.

Esta estrategia resulta especialmente útil para el control de oncogenes y ciertos elementos epigenéticos reguladores en el tratamiento del cáncer. Éstos fomentan el crecimiento anormal en las células, así como la proliferación descontrolada de células inmaduras e inhibición de la apoptosis de células tumorales. Mediante el uso CRISPR se puede silenciar la expresión de estos genes, de forma que se inhibe el desarrollo tumoral.

A pesar de que existen diferentes dianas sobre las que aplicar esta herramienta se ha resaltado la importancia del receptor PD-1 en el proceso de aparición y desarrollo tumoral. Este receptor reconoce a PD-L1, una proteína de la superficie de la célula tumoral. Esta interacción inhibe la cascada de señalización intracelular que activaría la célula T, de tal forma que ésta no puede destruir la célula cancerosa. Por tanto, el bloqueo de la expresión de PD-1 a través de CRISPR-Cas9 ayudará a las células T a realizar su actividad antitumoral.

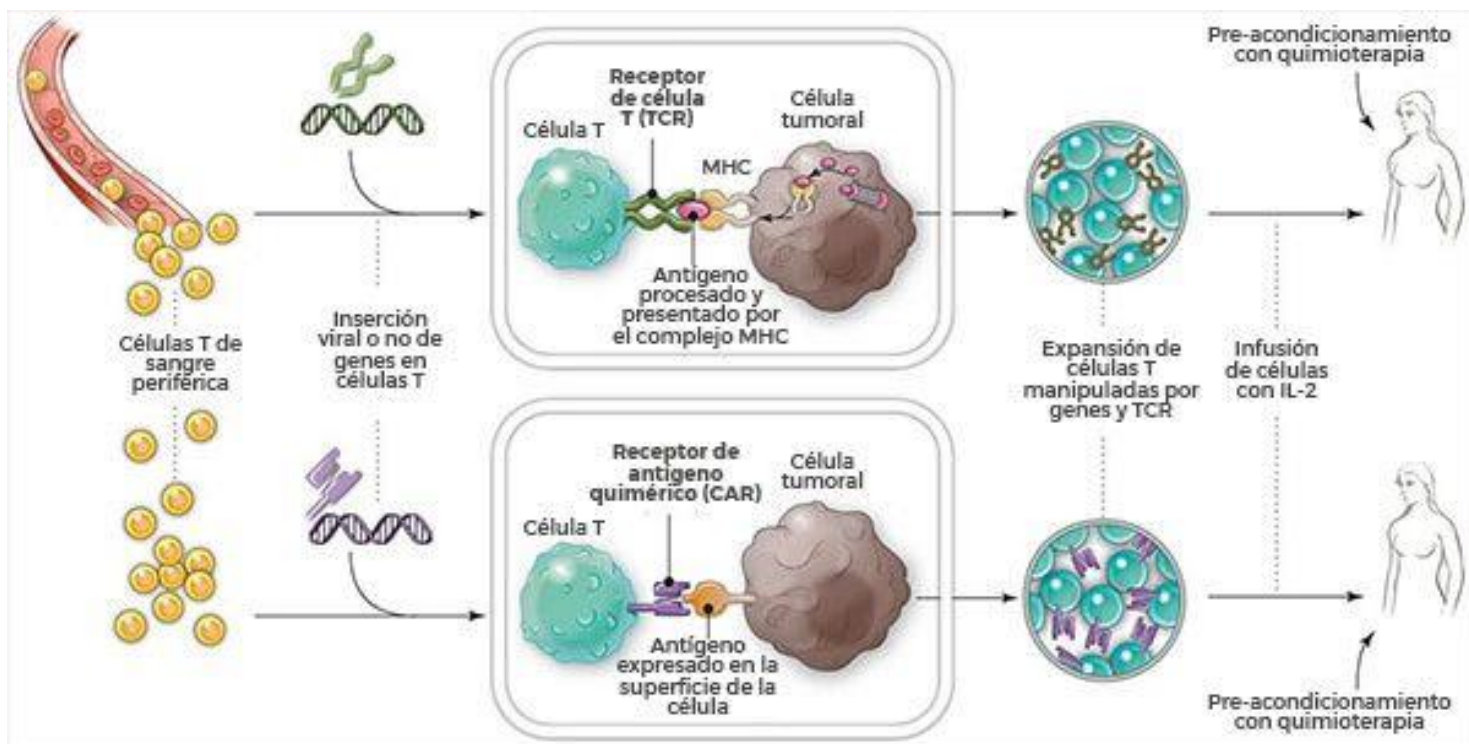
Applications	Target site	Study phase	Editing strategy	Clinical trials identification
Advanced esophageal cancer	PD-1	Phase II	PD-1 knockout	NCT03081715
Castration resistant prostate cancer	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02867345
Muscle-invasive bladder cancer	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02863913
Metastatic non-small cell lung cancer	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02793856
EBV associated malignancies	PD-1	Phase I Phase II	PD-1 knockout	NCT03044743
Metastatic renal cell carcinoma	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02867332
Relapsed or refractory leukemia and lymphoma	CD19 and CD20 or CD22	Phase I Phase II	Edit CD19 and CD20 or CD22	NCT03398967
Human papillomavirus-related malignant neoplasm	HPV16-E6/E7 HPV18 E6/E7	Phase I	HPV16-E6/E7 or HPV18 E6/E7 knockout	NCT03057912
CD19 + leukemia and lymphoma	TCR B2M	Phase I Phase II	TCR and B2M knockout	NCT03166878
Tumor of the central nervous system	NF1	—	Fix NF1 mutation allele	NCT03332030
Multiple myeloma Melanoma Synovial sarcoma Myxoid/round cell liposarcoma	TCR PD-1	Phase I	TCR and PD-1 knockout	NCT03399448

**Tabla 1.** Dianas para la aplicación de CRISPR-Cas9 en diferentes tipos de cáncer (Tian et al, 2019).

Otra aplicación de gran interés y que cubre, además del cáncer, algunos tipos de infecciones es la **transferencia celular adoptiva**. En este tipo de terapias se modifican ciertas características genéticas de la línea celular hematopoyética, con el objetivo de generar nuevas células con modificaciones de interés y poder ser reimplantadas en el paciente. Ya que la transferencia celular suele presentar problemas de histocompatibilidad entre individuos, se suele recurrir al trasplante autólogo, en el que el propio paciente actúa como donante. En este caso, tras la toma de una muestra de su sangre, se cultivan y modifican genéticamente las

células para obtener células pluripotenciales inducidas, con las mutaciones pertinentes. Posteriormente, las células se diferenciarán en distintos tipos celulares deseados y podrán ser administradas al paciente.

Esta técnica puede ser empleada para la búsqueda de la expresión del receptor antigénico quimérico CAR en las células T, para el tratamiento del cáncer. Al expresar este receptor en su membrana, se potencia el reconocimiento del antígeno tumoral de las células malignas por las células inmunológicas. De esta forma, el sistema inmune puede reconocer y eliminarlas más fácilmente.



**Figura 10.** Modificación de los receptores de las células T para la eliminación de células tumorales. La expresión del receptor CAR favorece el reconocimiento de la célula T ante el antígeno expresado en la superficie de la célula tumoral (Instituto Nacional del Cáncer).

Del mismo modo, la modificación de células hematopoyéticas es muy relevante para enfermedades como el SIDA, en la que la expresión de ciertos receptores de membrana es determinante para las etapas infectivas y de desarrollo de la enfermedad.

## 6. LIMITACIONES

De cara a la aplicación sanitaria, CRISPR-Cas9 tiene algunas limitaciones.

En primer lugar, el sistema permite una serie de desajustes en el emparejamiento del ARN guía con el ADN externo. Estos desajustes generan los denominados efectos *off-target*, que producen mutaciones no deseadas, pudiendo acarrear consecuencias graves para el paciente. A día de hoy supone un reto crear un sistema que mapee todos los puntos de unión de Cas9 al ADN exógeno. Existen diferentes técnicas desarrollándose en la actualidad que realizan secuenciaciones para localizar estos puntos de unión fuera del objetivo de la nucleasa. En este sentido, cada vez se descubren más secuencias *off-target*, lo cual permite un mayor avance en seguridad respecto al diseño de estructuras de ARN guías.

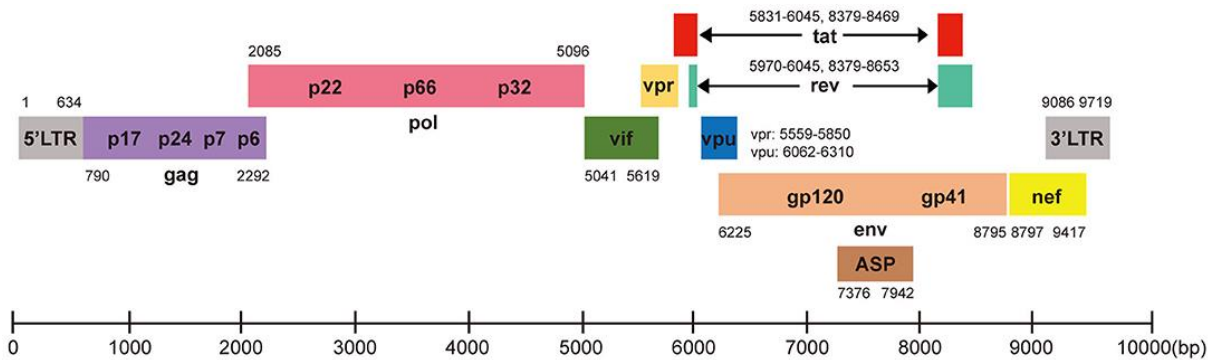
Otro obstáculo es el bajo número de nucleasas disponibles para un funcionamiento eficiente. De cara al uso terapéutico, interesa que las nucleasas tengan un tamaño relativamente pequeño. El gran tamaño da problemas de almacenamiento y liberación en los vectores habitualmente usados. En los últimos años se han descubierto más de diez enzimas con ventajas respecto a Cas9. Algunas de ellas requieren un fragmento de ARN guía más simple, y otras no producen los extremos romos que sí deja Cas9. No obstante, muchas de estas variantes necesitan secuencias PAM más complejas, y esto limita el alcance de la tecnología.

## 7. APLICACIÓN EN VIH

El SIDA es una enfermedad caracterizada por la pérdida progresiva de las defensas inmunológicas tras darse una infección por el virus VIH, que suele terminar con la muerte del paciente por la acción oportunista de un agente externo sobre el individuo inmunodeprimido.



Existen dos tipos principales de virus de inmunodeficiencia humana: VIH-1 y VIH2. VIH-1 es la principal causa de SIDA a nivel mundial, por lo que es el objetivo de estudio principal para diseñar un tratamiento efectivo. Se trata de un retrovirus cuyo genoma consiste en un ARN de 9,8kb. En ambos extremos del genoma se encuentran unas regiones que albergan secuencias en repetición, denominadas *LTR*. Estas secuencias son esenciales para la expresión de las proteínas virales, que jugarán un papel fundamental en los procesos de invasión y replicación vírica.



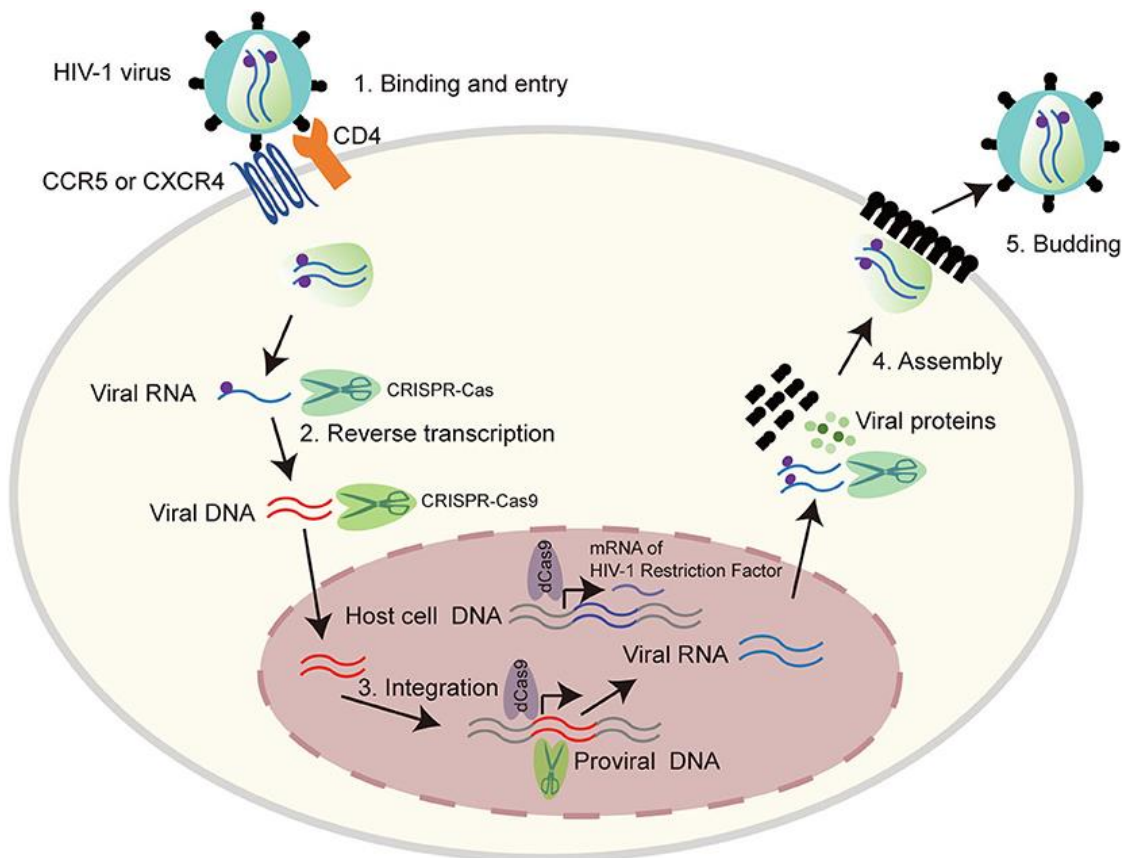
**Figura 11.** Genes contenidos en las secuencias *LTR* en el genoma proviral de VIH-1 (Xiao et al, 2019).

El proceso de invasión comienza con la unión de gp120, una de las proteínas de su cubierta, a un receptor CD4 de la membrana de una célula huésped. Luego se produce otra interacción con los co-receptores CCR5 o CXCR4, dependiendo del tropismo de la cepa viral. Las células infectadas corresponden mayoritariamente a células T, monocitos y células dendríticas, y también en células de la microglía, astrocitos y macrófagos en el SNC.

Una vez dentro de la célula, VIH-1 desarrollará dos tipos de infección: activa y latente. La **infección activa** se caracteriza por la producción de proteínas virales en el medio celular, lo que provoca la producción de nuevos viriones en la célula infectada, lisis de la misma y liberación de los virus. La **infección latente** se produce a través de diversos mecanismos que derivan en la integración del genoma vírico en la célula huésped. El resultado final es la formación de reservorios celulares que contienen el genoma vírico de forma silenciada. Éstos pueden ser reactivados a través de un estímulo, reestableciéndose la producción activa de viriones y promoviéndose la formación de más reservorios.



La estrategia terapéutica actual para el tratamiento de la infección por VIH se basa en el denominado “*shock and kill*”, que consiste en la reactivación de los reservorios latentes a través de un fármaco **LRA** (**L**atency-**R**eversing **A**gent), y posterior inducción de la muerte de las células infectadas a través de un antirretroviral y la acción del sistema inmunológico del individuo. No obstante, esta aproximación no es capaz de focalizar todos los reservorios virales y han sido reportados casos de efectos adversos tras la combinación de estas dos clases de fármacos. Es por ello necesaria la búsqueda de alternativas, con el fin de encontrar un método eficiente y seguro para la eliminación de los reservorios, que es de los objetivos de lucha principales contra esta enfermedad. Se ha comprobado que la tecnología CRISPR-Cas9 puede actuar en distintos niveles de la etapa infectiva del virus, así como en la fase de infección latente, convirtiéndose como una de las alternativas futuras más prometedoras para el abordaje terapéutico.



**Figura 12.** Ciclo vital del virus VIH-1 y etapas en las que CRISPR-Cas9 puede actuar (Xiao et al, 2019).

La aplicación de esta herramienta en la infección por VIH pasa por el bloqueo de determinados genes. El proceso de *knockout* se puede realizar directamente sobre el genoma viral, para anular la expresión del virus, y sobre ciertos genes de las células del sistema inmune encargados de la codificación de receptores esenciales en el proceso de reconocimiento del virus. En este último caso se realizaría a posteriori un trasplante autólogo con las células convenientemente modificadas.

Existen diferentes dianas en las que CRISPR-Cas9 puede actuar. Algunas de ellas se encuentran las secuencias LTR del genoma vírico, esenciales para los procesos de expresión genética. Para poder guiar al sistema hacia dichas regiones es necesario como guía un doble sgARN, ya que permite obtener más puntos de anclaje al material genético viral que un solo sgARN, y así prevenir sólidamente la evasión del virus. Con esta combinación se aumenta la eficiencia del corte del genoma proviral no integrado, previniendo su replicación y reduciéndose considerablemente los efectos fuera de objetivo.

CRISPR-Cas	Delivery	Target region	Cell type/organism	Targeting locus	Target sequence	Efficiency	References
SpCas9	Transfection	LTR (U3 region)	293T, HeLa, Jurkat	465-484	GTTAGACCAGATCTGAGCCT	30-90%	Ebina et al. (2013)
SpCas9	Transfection	LTR (U3 region)	CHME5, TZM-BI, U937	101-127 312-341	GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTT GAGTACTTCAAGAAGCTGCTGACATCGAGCT	30-90%	Hu et al. (2014)
SpCas9	Lentivirus	LTR (R region)	293T-CD4-CCR5, 293 Primary T cells, hPSC	464-486 485-507	GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGG GGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGG	20-90%	Liao et al. (2015)
SpCas9	Transfection	Rev (the second exon)	JLat10.6	8513-8532	GGTGGTAGCTGAAGAGGCAC	30%	Zhu et al. (2015)
SpCas9	Lentivirus	Gag/Pol/Rev/Env	SupT1	2249-2277 8497-8525	TCAGATCACTCTTTGGCAGCGAC GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCT	30-90%	Wang Z. et al. (2016)
SpCas9	Lentivirus	LTR (U3 and R region)	J.Lat FL, SupT1	300-408 463-482	GCCACTCCCCAGTCCCGCCC GCTCAGATCTGGTCTAACCA	35-98%	Lebbink et al. (2017)
SaCas9	Lentivirus AAV	LTR and gag (U3 region)	Tg26 transgenic mouse	83-103 380-399 1061-1081	GCAGAACTACACACCAGGGCC GTGTGGCCTGGGCGGGACTG GGATAGATGTAAGACACCA	20-80%	Yin et al. (2017)
SaCas9	Lentivirus	LTR (U3 region)	TZM-BI, C11	289-309, 9364-9384 379-399, 9454-9474	ACATGGCCCAGAGCTGCATC GGTGTGGCCTGGGCGGGACTG	20-60%	Wang Q. et al. (2018)

**Tabla 2.** Dianas genéticas de CRISPR-Cas9 en genoma proviral (Xiao et al, 2019).

Otra estrategia para anular la capacidad infectiva del virus es la inactivación del gen codificante para el co-receptor CCR5 de las células huésped. Se ha observado que individuos homocigotos para una delección de 32pb en dicho gen pueden resistir de forma natural una infección por VIH con tropismo hacia la región R5. La disrupción de este gen se consigue a través de la escisión del cuarto exón del gen CCR5, dándose la mutación CCR5 $\Delta$ 32. El silenciamiento del gen en distintas líneas celulares hematopoyéticas tendrá como resultado la producción de monocitos y macrófagos que no expresarán el co-receptor CCR5, de forma que no permitirán la invasión del virus.

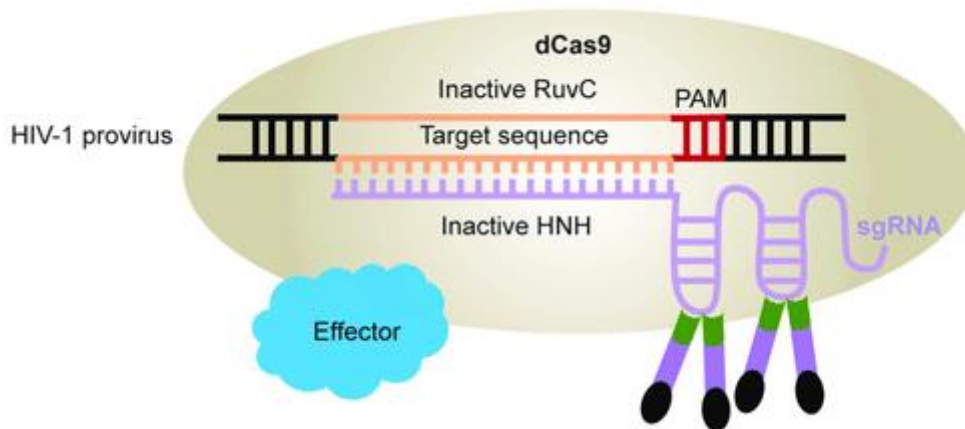
CRISPR-Cas9	Delivery	Target gene/restriction factors	Cells	Strategy	Target sequence	Efficiency (%)	References
SpCas9	Transfection	CCR5	K562	Disruption	TGACATCAATTATTATACAT	13	Cho et al. (2013)
SpCas9	Transfection	CCR5	iPSC	CCR5 $\Delta$ 32	GATACAGTCAGTATCAATTC	33–100	Ye et al. (2014)
SpCas9	Lentivirus	CCR5	TZM-BI, CEMss,	Disruption	GCTTGTGACACGGACTCAAG GGTCTGCCGCTGCTGTGCA GTAAACTGAGCTTGCTCGCT	10.8–67.7	Wang et al. (2014)
SpCas9	Lentivirus Adenovirus	CCR5	TZM-BI, CHO, C8166, primary CD4 <sup>+</sup> T	Disruption	TCACTATGCTGCCGCCAGT CAATGTGTCAACTCTTGACA	32–75	Li C. et al. (2015)
SpCas9	Transfection	CCR5	iPSC	Disruption	TGACATCAATTATTATACAT CATACAGTCAGTATCAATTC GACATTAAGATAGTCATCT	12.5–30.8	Kang et al. (2015)
SpCas9	Transfection	CCR5	K562, CD34 <sup>+</sup> HSPC	Disruption	ACTGGGCGGCAGCATAGTGA CCCAGAAGGGGACAGTAAGA	19–46	Xu et al. (2017)
SpCas9	Lentivirus	CCR5	Jurkat, primary CD4 <sup>+</sup> T	CCR5 $\Delta$ 32	ACAGTCAGTATCAATTCTGG GACATTAAGATAGTCATCT	40–60	Qi et al. (2018)
SpCas9	Lentivirus	CXCR4	Ghost, Jurkat, primary CD4 <sup>+</sup> T	Disruption	GCTTCTACCCCAATGACTTG GTTCCAGTTTCAGCACATCA	10–45	Hou et al. (2015)
SaCas9	Lentivirus AAV	CXCR4	TZM-BI, Ghost, Jurkat, primary CD4 <sup>+</sup> T	Disruption	CCTGGTATTGTCATCCTGTCC TCCTGCTATTGCATTATCATC	8.5–80	Wang et al. (2017)
SpCas9	Lentivirus	CCR5 and CXCR4	TZM-BI, Jurkat, primary CD4 <sup>+</sup> T	Disruption	GCTTCTACCCCAATGACTTG GTTCCAGTTTCAGCACATCA CATACAGTCAGTATCAATTC	15–40.5	Liu et al. (2017)
SpCas9	Lentivirus	Restriction factors	293T, CEMss	APOBEC3G(A3G) and APOBFC3B(A3B)	–	50–90	Bogerd et al. (2015)
–	–	Restriction factors	–	SERINC, HUSH, NONO	–	–	Rosa et al. (2015); Gonzalez-Enriquez et al. (2017); Chougui et al. (2018); Lahaye et al. (2018); Yurkovetskiy et al. (2018)

**Tabla 3.** Dianas genéticas de CRISPR-Cas9 en células huésped (Xiao et al, 2019).

También se ha valorado la posibilidad de interferir en la expresión del co-receptor CXCR4 a través de un modelo de CRISPR guiado por dos sgARN. El knockout de este gen se asocia a una menor producción de p24 en células infectadas. Sin embargo, la expresión de CXCR4 es

fundamental para algunos procesos de desarrollo celular hematopoyético y diferenciación tímica, por lo que siguen siendo necesarias evaluaciones de la seguridad sobre la supresión de este gen en la aplicación clínica.

Un importante objetivo para combatir la infección por VIH son los reservorios latentes. Para su eliminación es necesario reactivar la expresión de los virus integrados en las células que conformen estos reservorios. De esta forma, se puede inducir la muerte celular a través de la combinación de la terapia antirretroviral y la acción del sistema inmune. Una modificación del sistema CRISPR-Cas9, que consiste en utilizar la endonucleasa catalíticamente inactivada (*dCas9*; *deficient Cas9*), puede usarse para reactivar los reservorios. *dCas9*, fusionada con ciertos efectores y guiada por sgRNA, no cortará el ADN viral, no obstante mantiene su capacidad de unión al mismo. La unión a una región promotora del virus estimula la expresión genética de las secuencias LTR, produciéndose nuevos viriones, donde entrarán en juego los antirretrovirales.



**Figura 13.** *Cas9* catalíticamente inactiva (*dCas9*) fusionada con efectores que activan la expresión de VIH-1 (Xiao et al, 2019).

También se puede influir en las etapas infectivas del virus a través de la expresión de factores de restricción mediado por CRISPR-Cas9. Los factores de restricción impiden la replicación del virus, por lo que su expresión es interesante de cara al tratamiento de SIDA. Sin embargo, algunos de estos factores solo son expresados tras una etapa de infección. Esto

es una dificultad de cara a su aplicación médica, ya que habría que poner en riesgo al paciente para estudiar la influencia de estos factores sobre el desarrollo de la enfermedad.

Es conveniente resaltar el hecho de que existe una gran variabilidad interindividual para las secuencias LTR, por lo que se cree que serían necesarias al menos 10 estructuras diferentes de sgARNs para poder cubrirlas todas. El diseño de los ARN supone una gran dificultad teniendo en cuenta que todavía no están registradas todas las uniones *off-target*.

## 8. CONCLUSIONES

El sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta con un potencial muy elevado para ser aplicado en inmunoterapia, pero debe seguir investigándose en pos de resolver las limitaciones actualmente presentes. Los efectos fuera de objetivo son un claro obstáculo de cara a garantizar una completa seguridad de la tecnología. Los mecanismos de almacenamiento y liberación de nucleasas han de seguir siendo desarrollados con el objetivo de poder encontrar variantes que resuelvan los problemas de eficiencia actuales. Sin embargo, existen estrategias de abordaje inmunoterapéutico, como el bloqueo de PD-1 en el cáncer o la mutación de CCR5 en la infección por VIH, en las que esta herramienta ha demostrado ser efectiva. Todos los avances en ingeniería genética relacionados con CRISPR-Cas evidencian su potencial para la futura erradicación de ciertas enfermedades de alta carga genética. En este sentido, ante una época en la que el desarrollo biotecnológico está adquiriendo gran relevancia dentro de la investigación médica, CRISPR-Cas parece la opción más viable frente a un futuro en el que la edición del genoma se pueda aplicar de forma eficiente y segura.

En lo personal resulta enriquecedor poder observar qué detalles permiten tanto el progreso como las limitaciones encontradas en la aplicación de CRISPR-Cas9. La sensación de que se está abriendo una posibilidad nueva de tratamiento para algunas enfermedades actualmente incurables es esperanzadora, y será un sentimiento común dentro del mundo sanitario. La paciencia ante a los avances ha de ser necesaria de cara a comenzar una época en la que esta herramienta pueda aplicarse de forma segura, que igual está más cerca de lo que se ha podido creer.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. F. J. M. Mojica; F. R. Valera. The Discovery of CRISPR in archea and bacteria. *The Febs Journal*. **283**: 3162–3167 (2016).
2. A. Bolotín; B. Quinquis; S.D. Ehrlich. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. **151**: 2551–2561 (2005).
3. J.A.Doudna; E. Charpentier; M. Jinek; K. Chylinski; I. Fonfara; M. Hauer. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**: 816–821 (2012).
4. M. Adli. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications*. **9**:1911 (2018).
5. C. Liu; L. Zhang; H. Liu; K. Cheng- Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications. *J. Control Release*. **266**: 2– 5 (2017).
6. X. Tian; T. Gu; S. Patel; A. M. Bode; M. H. Lee; Z. Dong. CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. *Npj Precision Oncology*. **3:8** (2019)
7. J. M. K. M. Delhove; W. Qasim. Genome-Edited T-Cell Therapies. *Current Stem Cell Reports*. **2**: 124– 136 (2017).
8. C. Jian; L. Meng; B. Yang; X. Luo. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment. *Clinical Genetics*. (2019): 1–11.
9. Q. Xiao; D. Guo; S. Chen. Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Front Cell. Infect. Microbiol*. **9:69**: 1–11 (2019).
10. G. Hütter; D. Nowak; M. Mossner; S. Ganepola; A. Müssig; K. Allers; T. Schneider; J. Hofmann; C. Kücherer; O. Blau; I. W. Blau; W. K. Hofmann; E. Thiel et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *The New England Journal of Medicine*. **360**: 692–698 (2009).