



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

***CRISPR COMO HERRAMINETA DE EDICIÓN  
GENÉTICA Y SUS APLICACIONES EN LA SALUD  
HUMANA***

*Autor: Ignacio Beunza González*

*Tutor: Elvira Román González*

*Convocatoria: Junio*

## 1. RESUMEN

Desde su descubrimiento, el sistema inmune bacteriano bautizado como CRISPR/Cas9 se ha consolidado como una de las herramientas de edición genética más prometedoras debido a su versatilidad, fácil uso y buenos resultados, llegando incluso a desplazar a otras estrategias usadas desde hace más tiempo, como son las “Proteínas de Dedos de Cinc” o las “TALEN”. Estas ventajas quedan plasmadas en el gran número de aplicaciones que presenta esta herramienta en una amplia diversidad de campos. Resulta especialmente interesante por su impacto la aplicación del sistema CRISPR/cas9 al tratamiento de enfermedades humanas de base genética o epigenética directamente en individuos adultos, como es el caso del cáncer, o incluso de enfermedades infecciosas como es el SIDA. No obstante, el sistema presenta a día de hoy una serie de limitaciones y problemas que aún deben salvarse para que podamos hablar de una aplicación realmente útil, como es el problema de conseguir vehículos que lleven el sistema directamente al lugar de acción, problemas de especificidad en cuanto a lugares del ADN donde actúa de forma no deseada, o el hecho de que al ser una maquinaria extraña a nuestro organismo, éste genera inmunidad frente a él.

## 2. ANTECEDENTES

El establecimiento del ADN como material genético en el 1944 y el posterior descubrimiento en el 1953 de la doble hebra de ADN han supuesto el inicio de una nueva era en la que los avances en materia de genética y biología han sido enormes. Uno de los primeros avances fue el desarrollo de métodos químicos de síntesis de ADN en fase sólida, lo que permitió la detección y la exploración de los genomas. Posteriormente, el desarrollo a partir de los 70 de las tecnologías del ADN recombinante permitió fabricar y manipular ADN a voluntad. Enzimas como las polimerasas, ligasas o las endonucleasas de restricción, junto a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han permitido aislar genes y fragmentos de genes, además de la introducción de mutaciones en genes *in vitro*, en células y en organismos modelo. La llegada de las tecnologías de secuenciación de ADN y la rápida creación de registros con información sobre genomas enteros de un gran número y tipo de organismos, incluyendo los humanos, ha sido uno de los avances más significativos de las últimas dos décadas. En la actualidad, la revolución llega de la mano de la adaptación del sistema inmune adaptativo bacteriano CRISPR-Cas9 a la biotecnología. Se trata de una herramienta de

ingeniería genética basada en el principio de apareamiento de bases de Watson y Crick que, gracias a su facilidad de uso y eficiencia, desde su primera descripción en 1987, se está aplicando rápidamente en laboratorios de todo el mundo.

En el presente trabajo, se hace una revisión bibliográfica sobre los principales conocimientos actuales del sistema CRISPR/Cas9, incluyendo su utilidad frente a otras tecnologías, su mecanismo y generalidades, así como algunos ejemplos prácticos de su utilidad en terapia.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **A. HISTORIA DE UN DESCUBRIMIENTO**

Los primeros conocimientos de CRISPR datan del 1987. Cuando Nakata y colaboradores estudian un gen en *Escherichia coli* (*E. coli*) [1] se dan cuenta de la presencia de una serie de repeticiones de 29 nucleótidos en su genoma que, al contrario que otras repeticiones que toman estructura en tándem, estaban separadas por secuencias de 32 nucleótidos que no se repiten. Al secuenciarse otros genomas se vieron estas mismas repeticiones en otras bacterias y arqueas, lo que empieza a suscitar gran interés.

Posteriormente, el español F.J. Mojica y colaboradores clasificaron estas repeticiones como una familia aparte de repeticiones en tándem, presentes en el 40% de las bacterias secuenciadas y en el 90% de las arqueas[2]. Pese a desconocerse su función, el interés por estas secuencias crece. En 2002 un equipo en el que colabora el mismo FJ Mojica acuña el término CRISPR para nombrar dichas repeticiones, como acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*[3].

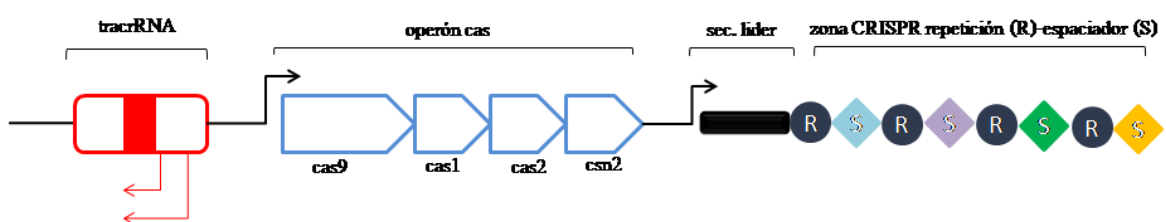
Ese mismo equipo describe los componentes que forman el locus CRISPR, y se ve que junto a las secuencias repetidas hay una serie de genes conservados que no están presentes en los organismos “CRISPR-negativos” [3]. Estos genes, denominados Cas (*CRISPR-associated*) codifican enzimas con actividad helicasa y exonucleasa, mientras que otras se relacionan con proteínas implicadas en la reparación del ADN u otras funciones como veremos más adelante. Esto, sumado a que presentan dominios de unión al ARN lleva a pensar que el sistema, denominado ahora CRISPR/Cas, debe estar implicado en el metabolismo del ADN, en la reparación del material genético o en la expresión de genes en los organismos que lo presentan.

2005 es un año clave pues se descubre que algunas de las secuencias presentes en el locus CRISPR (los espaciadores) se corresponden con material genético de origen extracromosómico, plásmidos conjugables o virus[5]. Dichas secuencias, de 30 pb aproximadamente, se intercalan entre las repeticiones en tándem y, por ello, se denominan espaciadores (*spacers* en inglés). Asimismo, se demuestra que dichos espaciadores tienen homología con ADN de fagos y elementos móviles de bacterias y que son los responsables de proteger a bacterias y arqueas de la infección por éstos[4]. Pero es que además, se ve que tras el enfrentamiento de una bacteria a una infección por un fago, es posible que la bacteria integre en su genoma material genético del virus en forma de un nuevo espaciador, modificando así su resistencia a futuras infecciones por ese virus[5]. Por este motivo, surge la hipótesis de que podría tratarse de un sistema inmune bacteriano adaptativo, pese a no saberse aún el funcionamiento del mismo.

En los siguientes años la investigación seafana en elucidar el mecanismo del sistema[6], y en estudios que demuestran que el sistema CRIPSR es transferible entre bacterias, incluso entre géneros muy distintos [7]. En los últimos años, se están realizando esfuerzos para la modificación y optimización del sistema CRIPSR en biotecnología y su implementación en numerosos campos, entre ellos en el tratamiento de enfermedades humanas[8,9,10], como ya comentaremos posteriormente.

## B. COMPONENTES Y FUNCIONAMIENTO BÁSICO DEL SISTEMA CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR funciona como un mecanismo de defensa de bacterias y arqueas frente a la entrada de ADN exógeno mediante la acción de una nucleasa que utiliza pequeños RNAs como “guías” para posicionarse en un lugar específico del genoma[11,12]. El sistema CRIPR, presente en los dos dominios de procariotas (Archaea y Bacteria) pero no en virus o eucariotas, está formado por distintos elementos, tal y como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Principales componentes del sistema CRISPR/Cas9 y su organización genética.

Lo más característico del sistema es la presencia de repeticiones directas, de unos 21 a 47 pb, palindrómicas e interrumpidas por secuencias del mismo tamaño que no se repiten (espaciadoras), y que se agrupan en uno o varios loci en el cromosoma[3]. Pese a la ausencia o presencia de similitud entre especies, las repeticiones tienen algunas características en común. Muchas de las repeticiones incluyen secuencias complementarias de GTT y AAC, dando cierta simetría, localizada sobre todo al final de la repetición [2]. Además, estas secuencias repetidas contienen fragmentos de tres o cuatro bases idénticas, generalmente de A o T, aunque también pueden encontrarse de G y C. La simetría de pares y los fragmentos de bases idénticas sugieren que podía haber existido una estructura secundaria particular del ADN.

Entre las repeticiones pueden encontrarse secuencias que se denominan “espaciadoras” (del inglés *spacers*), únicas de cada microorganismo, incluso para especies relacionadas entre sí. Tras su estudio, se llega a la conclusión de que se tratan de fragmentos de origen extra cromosómico, bien provenientes de plásmidos o bien de ADN de virus, y que deben de incorporarse al sistema CRISPR-Cas tras un contacto del microorganismo con los mismos[4]. Esta estructura de repeticiones agrupadas y regularmente separadas por espaciadores da nombre al sistema CRISPR, del inglés *Cluster Regulated Interspaced Short Palindromic Repeats*.

Varios estudios señalan la presencia de secuencias comunes flanqueando los múltiples loci CRISPR [13, 14, 15], denominadas “long repeats” (LRs) o secuencias líder. Tras su estudio, estas secuencias parecen tener una extensión de varios cientos de pares de bases y estar localizadas a un lado de los loci CRISPR, siempre con la misma orientación respecto a la secuencia repetida. Por otro lado, los nucleótidos de las secuencias líder de una determinada especie comparten una similitud de cerca del 80%, mientras que no existe homología de estas secuencias entre especies no relacionadas taxonómicamente. Estas secuencias, además, no presentan marco de lectura, lo que lleva a pensar que no codifican para ninguna proteína. Por último, se trata de secuencias que, salvo contadas excepciones, aparecen solo si hay un locus CRISPR cerca pero no en otras zonas del genoma. No obstante, algunas especies presentan dos secuencias líder truncadas (*Methanocaldococcus jannaschii*) y otras no presentan ninguna secuencia líder aunque tengan varios loci CRISPR (*E. coli*, *Sulfolobus sulfataricus*)[3].

Corriente arriba de la agrupación CRIPR se encuentra un conjunto de genes llamados genes Cas(del inglés, *CRISPR-associated genes*), que codifican proteínas esenciales para el

funcionamiento del sistema. Estos genes están ausentes en todas las especies CRISPR-negativas, así como en los genomas eucariotas, lo que sugiere una fuerte relación entre los genes cas y los loci CRISPR [3]. Además, determinan, entre otras cosas, los tres tipos de sistemas CRISPR/Cas que se conocen hoy en día. Por ser el más sencillo y fácil de manejar como herramienta en ingeniería genética principalmente se usa el tipo II, por lo que en el presente trabajo solamente se referencia y describe este tipo

El sistema CRISPR/Cas tipo II va a estar formado por Cas1, Cas2, Cas9 y en algunos casos una cuarta proteína: Csn1 o Cas4[16]. Cas9 participa en la adaptación, procesamiento del crRNA y en el corte del ADN diana [17], que como ya veremos es dirigido por el crRNA y un ARN adicional denominado tracrRNA (del inglés *trans-activating crRNA*) (Ver [apartado 4.D](#)).

Corriente arriba del locus Cas se encuentra una secuencia de 210 nucleótidos cuyo transcrito se denomina tracrRNA (del inglés *trans-encoded RNA*) pues son secuencias que se transcriben en *trans*, y que contienen fragmentos de unos 25 nucleótidos que aparean casi perfectamente con todas las repeticiones de CRISPR [12]. El tracrRNA dirige la maduración de pre-crRNA a crRNA (Ver [apartado 3.D](#)). En el proceso se debe de formar un dímero tracrRNA-crRNA capaz de actuar como sustrato de la RNasaIII, quién es capaz entonces de producir un corte en ambos ARNs [18].

### C. FUNCIONES DE CRISPR-Cas EN LOS MICROORGANISMOS

La mayoría de estudios sobre el sistema CRISPR-Cas se centran en su papel como sistema inmune bacteriano y en la protección frente a material genético invasor, pero cada vez es más evidente que participe también en otros procesos celulares, como la regulación de la virulencia, la evolución del genoma o la reparación del ADN. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína Cas1 de *E. coli* procesa especies de ADN tanto de cadena simple como ramificadas, horquillas de replicación y colas 5', así como que interacciona con proteínas como RecB, RecC y RuvB, lo que sugiere todo ello que podría estar implicada en procesos de reparación de ADN [19]. También se ha descrito que el sistema CRISPR-Cas se dispara cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas, lo que indica que pueda estar implicado en el manejo de estas acumulaciones masivas [20]. Por otro lado, hay muchos ejemplos de su participación en regulación genética, íntimamente ligada con el control de la virulencia. Por ejemplo, en *Francisella novicida* el sistema CRISPR-Cas tipo II reprime la

expresión de una lipoproteína endógena para evitar activar la respuesta inmune innata de los ratones[21], y en *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR está implicado en la inhibición de la formación de biopelículas por parte de un fago [22]. Por último, un locus CRISPR que ataque al cromosoma del propio huésped podría contribuir a la evolución genómica. Aunque este proceso en la mayoría de los casos sea letal, los mutantes que sobrevivan tendrán una reorganización genómica de gran escala [23].

En la mayoría de los casos no se sabe el mecanismo tras estas funciones, siendo necesaria una mayor investigación al respecto. Tampoco se sabe si estas otras funciones vinieron antes que la función inmune, en paralelo o después.

#### **D. MECANISMO COMO SISTEMA INMUNE BACTERIANO**

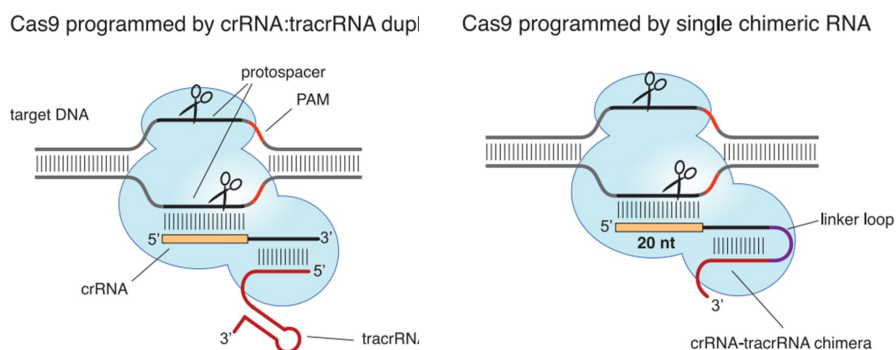
El proceso de defensa mediado por CRISPR-Cas se puede dividir en tres etapas: adaptación, expresión e interferencia [16].

En una primera etapa de adaptación, tras un contacto con material genético invasor se van a introducir nuevos espaciadores en el locus CRISPR, formados por fragmentos de ese material genético invasor. Esta etapa es la que confiere la “memoria genética”, necesaria para que se puedan dar las siguientes fases y que se puedan neutralizar los ácidos nucleicos re-invasores.

En una segunda etapa, la de expresión, tras un nuevo contacto con este material genético invasor el sistema se pone en marcha y se prepara para actuar frente a él, para lo cual expresa los genes Cas y se transcriben, por un lado CRISPR a una larga cadena de RNA precursora (pre-crRNA), y por otro tracrRNA. Ahora, pre-crRNA se une a tracrRNA (como ya hemos mencionado presentan homología en unos 25 nucleótidos) y ambos son procesados por la RNAsaIII y factores asociados para dar tracrRNA y crRNA (de “CRISPR-RNA”) maduros. Estos últimos están constituidos por unidades de RNA formadas por un espaciador y una repetición. TracrRNA y crRNA se mantienen unidos, y a través de tracrRNA se van a unir a Cas9. A la hora de su aplicación práctica en el laboratorio, se unen crRNA y tracrRNA en una sola molécula quimérica denominada sgRNA (del inglés *single-guide RNA*) capaz de dirigir a Cas9 al ADN diana [12,24].

Por último, en la fase de interferencia se lleva a cabo un reconocimiento y una destrucción del ADN invasor. Para el reconocimiento se necesita tanto un apareamiento de bases entre el crRNA y el ADN invasor como la presencia en ese ADN de una secuencia corta

junto al punto de corte, que se denomina PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*) (Ver Figura 2). Después, Cas 9 lleva a cabo el corte del ADN invasor (Figura 2).



**Figura 2.A.** Reconocimiento y procesamiento del ADN llevado a cabo por el complejo formado por Cas9-tracrRNA-crRNA. B. Reconocimiento y procesamiento del ADN pero usando en este caso un sgRNA (sacado de M. Jinek et al., 2012).

## - Mecanismos de resistencia generados frente a CRISPR-Cas

En paralelo al desarrollo por parte de las células de estrategias para combatir los virus, estos han desarrollado contramedidas frente a ellas. De esta forma existen distintos mecanismos para contrarrestar CRISPR-Cas. La forma más básica que tienen los virus para escapar a este sistema es la de la mutagénesis al azar de bases clave, como serían aquellas implicadas en la interacción con crRNA o en el reconocimiento de PAM[25,26].

También existen medidas más refinadas. Por ejemplo, algunos fagos, como los de *Pseudomonas aeruginosa*, son capaces de producir proteínas que afectan al funcionamiento de los complejos CRISPR-Cas [27, 28]. No se sabe exactamente el funcionamiento de dichas proteínas, pero no parece afectar a la expresión de Cas o crRNA.

De forma aún más extraordinaria, parece que algunos virus son incluso capaces de usar el sistema CRISPR-Cas para promover la infección. Por ejemplo, unos fagos de *Vibrio cholerae* portan un tipo de sistema CRISPR-Cas que ataca una zona del genoma de la bacteria, zona que contienen un sistema de defensa anti-fago[29].

## 4. APLICACIONES PRÁCTICAS

### A. INGENIERÍA (EPI)GENÉTICA

Hoy día existen fundamentalmente tres herramientas moleculares para la edición epigenética: las proteínas de dedos de Zinc (ZFs), las TALENs (del inglés *Transcription*



*Activator-Like Effectors Nucleases*) y el sistema basado en CRISPR/Cas9: sgRNA/Cas9. Todas ellas funcionan gracias a dominios de unión al ADN (DNA-binding domains o DBDs) personalizados, sin embargo, al contrario que en las otras herramientas de edición genética, en el sistema sgRNA/Cas9 el reconocimiento de la diana está mediado por una simple interacción entre pares de bases del sgRNA y del ADN invasor, sin necesidad de ninguna interacción proteína-DNA como pasa con las otras herramientas [30].

La principal ventaja de este sistema frente a los otros dos es que para cada nueva diana solo es necesario cambiar el sgRNA, manteniendo el mismo sistema de vehículo y la misma proteína Cas9, lo que reduce enormemente el tiempo, dinero y medios necesarios para implantar la tecnología [31]. Además, como se puede modificar químicamente la molécula de ARN se puede aumentar su estabilidad [32]. También es importante el hecho de que puede usarse tanto para edición genética como epigenética, usando variantes de Cas9 que sean inactivas catalíticamente [33,34,35]. Por otra parte, al tratarse de un sistema que se está estudiando mucho y en una gran variedad de organismos se siguen descubriendo proteínas Cas que mejoran, por ejemplo, la especificidad de la edición, lo que da una idea de que el potencial biológico del sistema solamente se está empezando a explorar [36,37,38]. El principal problema de esta tecnología es que para vehicularlo se requieren vectores de gran capacidad. Además, los datos sobre los efectos en ADN no deseado son dispares [39-43].

## **B. USOS GENERALES, DISTINTAS ÁREAS DE IMPACTO**

El control genético y epigenético de las células que posibilita CRISPR-Cas supone que el sistema sea interesante para una gran número de aplicaciones en distintas áreas, desde la biología básica hasta la biotecnología o la medicina (Figura 3) [44]. Esta tecnología facilita la generación de modelos animales y celulares más preparados para estudios farmacológicos o que permitan un mejor entendimiento de las enfermedades humanas (apartados “Animal models” y “Genetic variation”).

La manipulación de circuitos biológicos también facilita la obtención de materiales sintéticos útiles, como aquellos derivados de algas, o bien el uso de diatomeas con estructuras de sílice para vehicular fármacos vía oral (“Materials”). La edición genética permite la obtención de cultivos más resistentes al clima o a las infecciones patógenas, aumentando la seguridad alimentaria (“Food”). La manipulación de rutas metabólicas también puede llevar a conseguir algas o maíz productores de etanol, haciendo el sistema también interesante en el

ámbito de la producción de biocarburantes sostenibles y rentables (“Fuel”), pero también, en la misma línea, puede ser usado para conseguir factorías bacterianas que produjesen grandes cantidades de fármacos, reduciendo el coste y aumentando la accesibilidad a tratamientos terapéuticos de utilidad (“Drug development”). Por último, la modificación directa de desórdenes genéticos o epigenéticos podría llevar a corregir de raíz enfermedades de base genética (“Gene surgery”). Por su impacto sobre la salud humana, en el presente trabajo nos vamos a centrar en ésta última aplicación, viendo dos ejemplos donde se ha usado sgRNA/Cas9 en terapia con éxito.



**Figura 3.** Aplicaciones de la Ingeniería genética (imagen tomada de Patrick D. Hsu et al., 2014).

## C. EJEMPLOS PRÁCTICOS: UTILIDAD EN TERAPIA HUMANA

### I. Objetivo

En lo visto por el momento, el sistema CRISPR/Cas9 se presenta como un método novedoso que permite la modificación de las células con un gran número de aplicaciones. Ahora, se va a tratar de demostrar el potencial terapéutico del sistema CRISPR/Cas9, así como su versatilidad. Para ello se han seleccionado en la bibliografía ejemplos de enfermedades representativa en el ser humano y en las cuales CRISPR-Cas9 podría tener utilidad: un osteosarcoma [45], como ejemplo de un cáncer, y el SIDA [10].

### II. Materiales y métodos

Para la realización del presente apartado se han consultado artículos de revistas como Life, Science o Nature, así como bases científicas como PubMed.

### III. Aplicación de CRISPR-Cas9 en el tratamiento del osteosarcoma

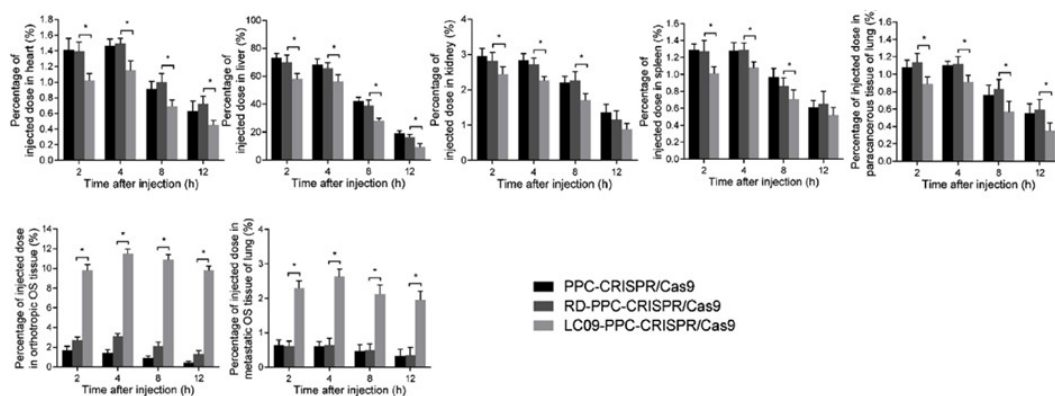
El osteosarcoma (OS) es un cáncer pediátrico extremadamente agresivo que se caracteriza por una frecuente (25-30%) metástasis distal [46], siendo la más frecuente la del pulmón [47], así como por fracturas patológicas causadas por la destrucción del hueso [48]. El tratamiento convencional se basa en la cirugía combinada con quimioterapia, pero, sin embargo, el pronóstico para los pacientes con OS que presentan metástasis es significativamente peor [49]. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento para estos pacientes.

El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), altamente expresado en el OS, no solamente contribuye a la angiogénesis en el microambiente tumoral vía estimulación paracrina, sino que también actúa como un factor de supervivencia autocrina para las propias células tumorales [50,51,52]. Por otro lado, la inhibición de la señalización de VEGFA suprime el crecimiento del OS, su metástasis y angiogénesis, lo que sugiere que sea una posible diana terapéutica para el OS [53,54,55]. Ya existen estrategias terapéuticas frente a VEGFA para tratar los tumores [56], como es el caso de un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante anti VEGFA, el bevacizumab, aprobado para el tratamiento de distintos tipos de tumores, incluido el OS [57,58]. Sin embargo, el bevacizumab también bloquea la producción de VEGFA en órganos normales si se usa de forma sistémica, y además produce efectos adversos como hipertensión, proteinuria e infecciones de las vías respiratorias superiores [59]. Por su gran especificidad y eficiencia, se elige el sistema CRISPR/Cas9 como posible alternativa para el tratamiento.

Para aplicar el sistema CRISPR/Cas9 se diseña un plásmido que contiene un ARN guía (gRNA) frente al VEGFA y Cas9, pero el primer problema a la hora de usar ésta herramienta en terapia es el diseño de sistemas que permitan su aplicación directamente en los tejidos diana. Para conseguirlo, en este estudio se usan dos recursos. Por un lado se selecciona un aptámero, que son hebras simples de ADN o ARN capaces de reconocer proteínas específicas en células diana, ya usadas para la dirección de drogas quimioterápicas o de ARNs de interferencia al lugar de acción deseado. En el caso presente, se selecciona un aptámero específico de las células del OS que no se une a otras células: LC09. Por otro lado, ese aptámero se conjuga a un lipopolímero que permite encapsular el plásmido que contiene CRISPR/Cas9. Se elige el lipopolímero PPC, compuesto por polietilimina (PEI), metoxipolietilenglicol (PEG) y colesterol (CHOL), pues ya ha demostrado sus ventajas a la hora de vehicular genes, como por ejemplo su gran capacidad de transporte o la posibilidad

de someterle a modificaciones sofisticadas [60,61,62], así como un perfil de seguridad excelente en ensayos clínicos de fase II [63].

Para el estudio de la efectividad de este sistema, se utiliza un modelo murino resultante de la inoculación intraósea de células de OS, en el que los ratones desarrollan OS ortotópico así como metástasis pulmonar. Los ratones resultantes se dividen y a cada grupo se le inyecta un tipo de formulación para el plásmido de CRISPR/Cas9: plásmido encapsulado en PPC sin aptámero (PPC-CRISPR/Cas9), plásmido encapsulado en PPC con un aptámero aleatorio (RD-PPC-CRISPR/Cas9) y plásmido encapsulado en PPC y con el aptámero LC09 (LC09-PPC-CRISPR/Cas9). Después se mide la especificidad en la distribución del sistema en los tejidos *in vivo* (Figura 4), pudiéndose apreciar como el porcentaje de dosis inyectada en corazón, hígado, riñones, bazo o tejido pulmonar alrededor del tejido canceroso cae en gran medida con el tiempo, independientemente de la formulación empleada. Por su parte, el porcentaje de dosis inyectada presente en el tejido OS ortotópico así como en el tejido OS pulmonar metastásico(ambos forman los “tejidos OS”) es relativamente bajo en todas las formulaciones menos peropara LC09-PPC-CRISPR/Cas9, donde además se mantiene más constante en el tiempo.



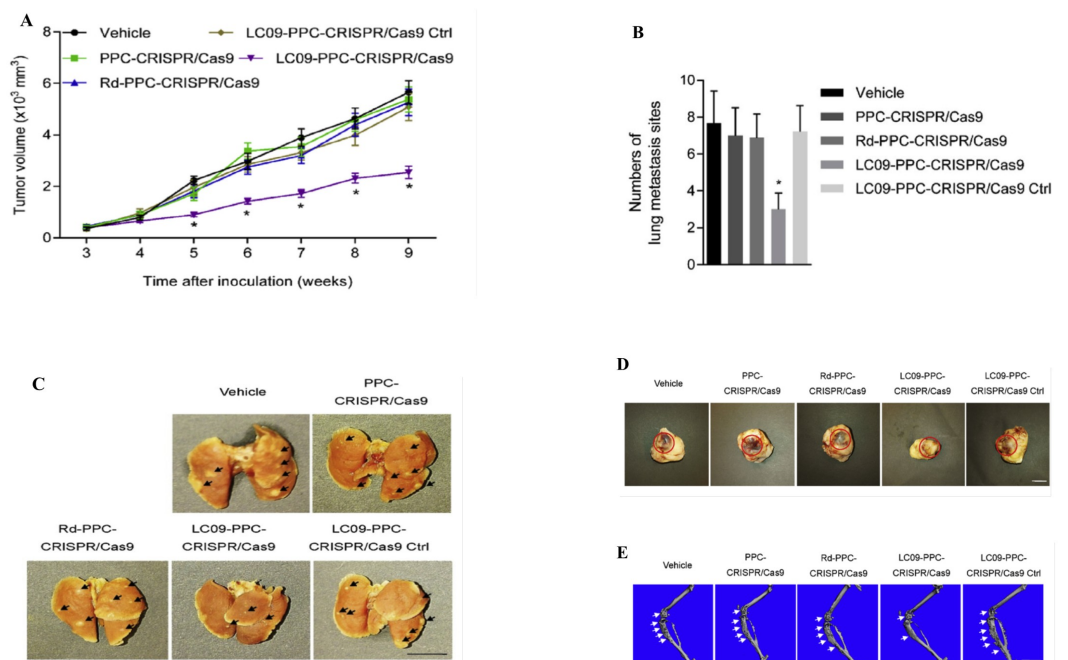
**Figura 4.** Porcentaje de dosis inyectada presente en distintos órganos *in vivo* al cabo de 2, 4, 8 y 12 horas para las tres formulaciones de CRISPR/Cas9 (C. Liang et al., 2017).

Además, a partir del segundo día de la administración, la expresión de Cas9 del grupo LC09-PPC-CRISPR/Cas9 en los tejidos OS es mucho mayor que en los grupos PPC-CRISPR/Cas9 o RD-PPC-CRISPR/Cas9. Los niveles de Cas9 en ambos tejidos, para el grupo LC09-PPC-CRISPR/Cas9 alcanzan el máximo a los 8 días, bajan a la mitad a los 14 y se mantienen significativos hasta el día 17, lo que podría indicar que 14 días (dos semanas) podría ser el intervalo adecuado de dosificación para el tratamiento *in vivo*.

Después de tres semanas los ratones inoculados con LC09-PPC-CRISPR/Cas9 presentan, comparando con los grupos inoculados con el vehículo (PBS), PPC-CRISPR/Cas9, RD-PPC-CRISPR/Cas9 y el control de LC09-PPC-CRISPR/Cas9, una serie de características:

- Muchas más deleciones en los tejidos OS, pero muchas menos en el hígado, que el resto de formulaciones.
- Un estudio inmunohistoquímico demuestra que presentan una expresión reducida de VEGFA en los tejidos OS, así como de Ki67 (un marcador de proliferación), Ezrin (un marcador de metástasis), MMP9 (un marcador de invasión) y de Survivina (un marcador antiapoptosis).
- Un menor número de metástasis pulmonares (Figura 5B y 5C) que el resto de grupos, así como una menor neovascularización (Figura 5D).
- Una menor expresión de marcadores de activación celular, incluyendo CD4 y el factor de Von Willebrand.
- Una disminución del tejido óseo en los tejidos OS, así como un menor tamaño del tumor (Figura 5A) y del daño al hueso (Figura 5E).

También se mide el grado de toxicidad de LC09-PPC-CRISPR/Cas9 tras múltiples inyecciones mediante análisis bioquímicos (función hepática y renal) y hematológicos (hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), sin detectarse ningún cambio significativo respecto al vehículo (PBS).



**Figura 5.** A. Volumen tumoral para las distintas formulaciones medido desde la semana 3 hasta la 9. B. Número de metástasis pulmonares para las distintas formulaciones. C. Necropsias pulmonares de los distintos grupos de ratones, en función de la formulación administrada. Las flechas negras señalan los focos tumorales metastásicos. D. Efecto sobre la neovascularización para las distintas formulaciones. E. Lesiones

óseas para los distintos grupos. Las flechas señalan los puntos donde hay lesión ósea. (Fotos sacadas de C. Liang et al., 2017).

#### IV. Aplicación de CRISPR/Cas9 en el tratamiento del SIDA

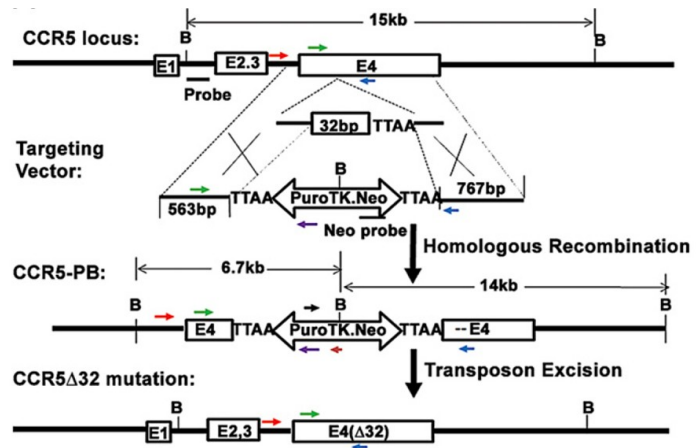
El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) tiene tropismo por los receptores de quimioquinas C-C tipo 5 (CCR5) de las células T, macrófagos y otros tipos celulares. Se ha visto que los individuos homocigotos o heterocigotos para una mutación en el exón 4 del gen CCR5 que implica la delección de 32 pares de bases (CCR5 $\Delta$ 32) desarrollan la enfermedad de forma más lenta o generan resistencia a esta infección, respectivamente [64,65,66].

La resistencia podría adquirirse en individuos desarrollados a partir del trasplante de células madre hematopoyéticas que contengan la mutación. Hay casos registrados de curación al VIH tras un trasplante alogénico con células madre hematopoyéticas a partir de un donante CCR5 $\Delta$ 32 homocigoto [67]. El problema de este tipo de trasplantes es que no se puede aplicar de forma generalizada, primero porque los individuos CCR5 $\Delta$ 32 homocigotos no son frecuentes, segundo porque se dan problemas de histocompatibilidad entre individuos con distinto HLA, y tercero porque se requieren trasplantes de médula y ablaciones medulares totales. Esto podría solucionarse mediante un trasplante autólogo en el que el paciente actúa como su propio donante, como es el caso del presente estudio, donde se emplean células pluripotenciales inducidas o iPSCs (del inglés *induced pluripotent stem cells*) obtenidas a partir de las propias células del paciente, que pueden extraerse mediante la toma de una pequeña muestra de sangre, transformarse en iPSCs, modificarse mediante edición genética y después diferenciarse a distintos tipos celulares de interés para posteriormente llevarse a cabo el trasplante autólogo.

Para producir la mutación CCR5 $\Delta$ 32, imitando la que se produce de forma natural en el ser humano y sin dejar ninguna otra secuencia residual, se emplea una estrategia en la que se usa un transposón y la tecnología CRISPR/Cas9, así como las TALEN previamente citadas (ver Apartado 4A), lo cual nos va a servir además para realizar una comparativa de la efectividad de una u otra herramienta.

Se ve que a ambos lados de la secuencia que se pretende deleccionar hay un tetranucleótido TTAA, por lo que se utiliza la tecnología *PiggyBac* y se diseña un transposón que contiene dos de estas secuencias flanqueando genes de resistencia a puromicina y neomicina, que posteriormente servirán para la selección de aquellas células que hayan incorporado el transposón por recombinación homóloga gracias a esas secuencias TTAA,

eliminando esos 32pb, y por tanto que sean mutantes resistentes a esos antibióticos. Ese transposón será eliminado finalmente mediante la inducción de la expresión de una transposasa, dejando en el genoma no más huella que la delección de esos 32pb (Figura 6). Para aumentar la eficacia de la recombinación homóloga lo que se hace es previamente generar un corte, para lo cual entran en escena Cas9 y las proteínas TALEN.



**Figura 6.** Estrategia para producir la mutación CCR5Δ32 sin dejar rastro, usando la tecnología piggyBac (Ye et al., 2014).

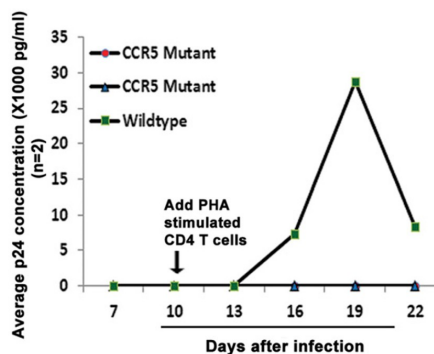
Tras el diseño de un ARN guía (gRNA), que debe ser muy preciso debido a la similitud entre las secuencias genéticas de CCR5 y de CCR2, se cotransfectan las iPSCs, previamente obtenidas, con el transposones y sgRNA/Cas9 o TALEN. Los resultados demuestran una mayor eficiencia en la edición bialélica para Cas9, así como una menor frecuencia de Recombinación No Homóloga (Figura 7), lo cual pone en evidencia la mayor eficacia de la tecnología CRISPR/Cas9 para este tipo de aplicaciones.

**Figura 7.** Comparativa entre la eficacia de TALENs y del sistema CRISPR/Cas9 en actuar sobre el locus CCR5 (Ye et al., 2014).

| Method            | HR efficiency | Biallelic targeting efficiency | NHEJ efficiency |
|-------------------|---------------|--------------------------------|-----------------|
| TALEN (L538-R557) | 100%          | 10%                            | 45%             |
| CRISPR-Cas9       | 100%          | 33.3%                          | 25%             |

Ahora, para demostrar que las células mutantes obtenidas son realmente resistentes a la infección por VIH-1 lo que se hace es diferenciarlas a monocitos y macrófagos. Después, tanto éstas como macrófagos y monocitos obtenidos de iPSCs no mutantes (“wild tipe” o WT) se cultivan durante 24 días y se ponen en contacto con un VIH-1 con tropismo por CCR5 durante 1 día, tras lo cual el virus se retira mediante lavado, para posteriormente, a los 10 días, añadir fito hemaglutinina para amplificar el virus. A partir del día 16 se puede detectar la replicación viral en las células provenientes de iPSCs WT , pero no en aquellas células provenientes de líneas mutadas (Figura 8).

**Figura 8.** Detección del antígeno p24 del virus HIV1 para los cultivos de macrófagos y monocitos mutantes y los provenientes de iPSCs WT a partir del séptimo día (Ye et al., 2014).



Los resultados por tanto demuestran que la mutación CCR5 $\Delta$ 32 puede proporcionar resistencia frente al virus, lo que, sumado a que los individuos que presentan dicha mutación no presentan otros efectos clínicos relevantes [64], hace que CCR5 sea considerado como una diana para la terapia génica del SIDA, y CRISPR/Cas9 como una herramienta para llevar ésta a cabo. Una de las principales preocupaciones al usar esta herramienta es que se puedan producir efectos fuera de la diana deseada, pero el estudio de estos efectos analizándose cambios en la secuencia de las iPSCs parenterales y modificadas demuestra que estos no se han producido, gracias probablemente a un buen diseño del gRNA.

## 5. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que el sistema CRISPR/Cas9 es una herramienta útil en una gran variedad de ámbitos, siendo entre estos especialmente interesante por su repercusión el del tratamiento de las enfermedades humanas. El gran interés que ha despertado ha llevado a que en pocos años se haya avanzado muchísimo en el conocimiento de su funcionamiento y de sus aplicaciones prácticas. Incluso en un futuro, podría llegar a poderse tratar enfermedades, tanto de índole genética como no genética, como ya hemos sugerido a través de los ejemplos prácticos seleccionados, directamente en individuos adultos y que hasta ahora solamente tenían tratamientos sintomáticos u agresivos, atacando directamente a la raíz del problema e incluso llegar a hacer que éste desaparezca. No obstante para poder ver aplicado este sistema en humanos aún se deben superar una serie de obstáculos, ya que a los problemas éticos que supone la manipulación genética en humanos se debe sumar una serie de problemas prácticos.

En primer lugar el sistema entraña riesgos por su mecanismo en sí, ya que podría generar cortes en lugares no deseados del genoma, produciéndose mutaciones que de forma potencial lleven al desarrollo de un cáncer u a otra deficiencia genética. Esto ha llevado a que rápidamente se busquen formas de aumentar la especificidad de CRISPR/Cas9.



Por otro lado, cuando se genera un corte de DNA para que la célula lo repare, se aporta una hebra de DNA que deberá introducirse en el lugar adecuado mediante un proceso que se conoce como reparación dirigida por homología o HDR (del inglés *homology-directed repair*), solamente activo en células en división [68]. El problema es que la mayoría de las células en el cuerpo humano de normal no se dividen, por lo que para solucionar esto es necesario activar los genes de la HDR mediante determinados fármacos.

En tercer lugar está el problema de vehiculizar la maquinaria CRISPR/Cas9 hasta el lugar de acción. Para ello se han desarrollado distintas estrategias, incluyendo tanto vectores virales como no virales [69], como es el caso del lipopolímero usado en el ejemplo del osteosarcoma. Los vectores virales son una forma eficaz de vehiculizar el sistema, aunque uno de sus principales problemas, además de su pequeña capacidad de carga, es que el sistema CRISPR/Cas9 seguiría produciéndose por las células incluso después de que el problema se hubiera solucionado, llevando a que se produzcan cortes no deseados.

Por último tenemos un problema de inmunidad, ya que la proteína Cas9 es exógena al cuerpo humano y por tanto podría actuar como un antígeno. De hecho se ha detectado inmunidad adaptativa, tanto humoral como celular, pre existente en humanos frente a la proteína Cas9, tanto de *Staphylococcus aureus* como de *Streptococcus pyogenes* [70]. Este tipo de respuestas no solo podría resultar en una ineficiencia terapéutica, sino que podría llevar a una respuesta inflamatoria sistémica, dando lugar a una importante toxicidad e incluso la muerte [71]. No obstante, lo cierto es que para producirse dicha toxicidad es necesario que la proteína entrara en contacto directo con el sistema inmune, lo que no pasa en la mayoría de estrategias, tanto in vivo como in vitro, de vehiculizar el sistema CRISPR/Cas9. Por ello, los anticuerpos IgG tampoco serían capaces de actuar frente a ella y de reducir su eficacia terapéutica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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; 169:5429–5433. [PubMed: 3316184]
- [2] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *MolMicrobiol.* 2000; 36:244–246. [PubMed: 10760181]
- [3] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *MolMicrobiol.* 2002; 43:1565–1575. [PubMed: 11952905]
- [4] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J MolEvol.* 2005; 60:174–182. [PubMed: 15791728]
- [5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-12.[PubMed: 17379808]

- [6] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010; 468:67–71. [PubMed: 21048762]
- [7] Sapranaukas R1, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(21):9275-82.[PMID: 21813460]
- [8] Liang C, Li F, Wang L, Zhang ZK, Wang C, He B *et al*. Tumor cell-targeted delivery of CRISPR/Cas9 by aptamer-functionalized lipopolymer for therapeutic genome editing of VEGFA in osteosarcoma. *Biomaterials*. 2017 ; 147:68-85. [PMID: 28938163]
- [9] He ZY, Zhang YG, Yang YH, Ma CC, Wang P, Du W *et al*. In Vivo Ovarian Cancer Gene Therapy Using CRISPR-Cas9. *Hum Gene Ther*. 2018; 29(2):223-233. [PMID: 29338433]
- [10] Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z *et al*. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(26):9591-6. [PMID: 24927590]
- [11] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP *et al*. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008; 321(5891):960-4. [PMID: 18703739]
- [12] 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):816-21. [PMID: 22745249]
- [13] Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG *et al*. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science*. 1996; 273: 1058–1073.
- [14] Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum K. *et al*. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*. 1997; 390: 364– 370.
- [15] Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T *et al*. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol*. 1997; 179: 7135–7155.
- [16] Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015:119-28. [PMID: 25868999]
- [17] Wei Y, Terns RM, Terns MP. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation, *Genes Dev*. 2015; 29 (4): 356-361.
- [18] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA *et al*. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011; 471(7340):602-7.
- [19] Babu M, *et al*., A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol. Microbiol*. 2011;79 (2): 484-502.
- [20] Perez-Rodriguez R, *et al*. Envelope stress is a trigger of CRISPR RNA mediated DNA silencing in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol*. 2011; 79 (3): 584-599.
- [21] Sampson TR *et al*. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*. 2013; 497 (7448): 254-257.
- [22] Zegans ME *et al*. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 2009; 191 (1):210-219.
- [23] Vercoe RB *et al*. Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS Genet*. 2013; 9 (4):1003454.
- [24] Dang Y, Jia G, Choi J, Ma H, Anaya E, Ye C *et al*. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*. 2015;16:280. [PMID: 26671237]
- [25] Semenova E *et al*. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2011; 108 (25): 10098-10103.
- [26] Deveau H *et al*. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol*. 2008; 190 (4): 1390-1400.
- [27] Bondy-Denomy J *et al*. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*. 2013; 493 (7432): 429-432.
- [28] Pawluk A *et al*. A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*. 2014; 5 (2): 00896.
- [29] Seed KD *et al*. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity, *Nature*. 2013; 494 (7438): 489-491.
- [30] Waryah CB, Moses C, Arooj M, Blancafort P. Zinc Fingers, TALEs, and CRISPR Systems: A Comparison of Tools for Epigenome Editing. *Methods Mol Biol*. 2018;1767:19-63.
- [31] Cano-Rodriguez D, Rots MG. Epigenetic editing: on the verge of reprogramming gene expression at will. *Curr Genet Med Rep*. 2016; 4(4):170–179
- [32] Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, Steinfeld I, Lunstad BD, Kaiser RJ, Wilkens AB. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol*. 2015; 33(9):985–989.
- [33] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP *et al*. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013; 152(5):1173–1183.

- [34] Baohui Chen, Luke A. Gilbert, Beth A. Cimini, JoergSchnitzbauer, Wei Zhang, Gene-Wei Li *et al.* Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell.* 2013; 155(7): 1479–1491.
- [35] Gao X, Tsang JC, Gaba F, Wu D, Lu L, Liu P. Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(20):e155–e155
- [36] Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 2015; 520(7546):186–191
- [37] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(11):722–736
- [38] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015; 163(3):759–771.
- [39] Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB *et al.* Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(7):670–676
- [40] Kuscu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(7): 677–683
- [41] Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim J-S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 2014; 24(1):132–141
- [42] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(9):827–832.
- [43] Polstein LR, Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Bledsoe P, Song L *et al.* Genome-wide specificity of DNA binding, gene regulation, and chromatin remodeling by TALE-and CRISPR/ Cas9-based transcriptional activators. *Genome Res.* 2015; 25(8):1158–1169
- [44] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014; 157(6):1262–78.
- [45] Liang C, Li F, Wang L, Zhang ZK, Wang C, He B *et al.* Tumor cell-targeted delivery of CRISPR/Cas9 by aptamer-functionalized lipopolymer for therapeutic genome editing of VEGFA in osteosarcoma. *Biomaterials.* 2017;147:68-85.
- [46] Saha D, Saha K, Banerjee A, Jash D. Osteosarcoma relapse as pleural metastasis. *South Asian J. Cancer* 2. 2013; 56.
- [47] Staddon AP, Lackman R, Robinson K, Shrager JB, Warhol M. Osteogenic sarcoma presenting with lung metastasis. *Oncologist* 7 (2002) 144-153.
- [48] Kundu ZS. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J. Orthop.* 2014; 48: 238-246.
- [49] Gill J, Ahluwalia MK, Geller D, Gorlick R. New targets and approaches in osteosarcoma. *Pharmacol. Ther.* 2013; 137: 89-99.
- [50] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J ClinOncol.* 2002;20:4368-4380.
- [51] G. Niu, X. Chen, Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy, *Curr. Drug Targets.* 2010; 11: 1000-1017.
- [52] Nguyen M. Angiogenic factors as tumor markers, *Investig. New Drugs.* 1997; 15: 29-37.
- [53] Tanaka T, Yui Y, Naka N, Wakamatsu T, K. Yoshioka, Araki N *et al.* Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy, *Clin. Exp. Metastasis.* 2013; 30: 369-379
- [54] Daft PG, Yang Y, Napierala D, Zayzafoon M. The growth and aggressive behavior of human osteosarcoma is regulated by a CaMKII-controlled autocrine VEGF signaling mechanism. *PLoS One.* 2015; 10 :0121568.
- [55] Zhao J, Zhang ZR, Zhao N, Ma BA, Fan QY. VEGF silencing inhibits human osteosarcoma angiogenesis and promotes cell apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8: 12411-12417.
- [56] McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 5. 2000; Suppl 1: 3-10.
- [57] Chen HX, Gore-Langton RE, Cheson BD. Clinical trials referral resource: current clinical trials of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab. *Oncology.* 2001. 15: 1017, 20, 23-26.
- [58] Turner DC, Navid F, Daw NC, Mao S, Wu J, Santana VM *et al.* Population pharmacokinetics of bevacizumab in children with osteosarcoma: implications for dosing, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2014; 20: 2783-2792.
- [59] Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer, *Br. J. Cancer.* 2007; 96: 1788-1795.
- [60] Fewell JG, Matar M, Slobodkin G, Han SO, Rice J, Hovanes B *et al.* Synthesis and application of a non-viral gene delivery system for immunogene therapy of cancer, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 2005; 109: 288-298.
- [61] Wang DA, Narang AS, Kotb M, Gaber AO, Miller DD, Kim SW *et al.* Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery. *Biomacromolecules.* 2002; 3: 1197-1207.
- [62] Furgeson DY, Cohen RN, Mahato RI, Kim SW. Novel water insoluble lipoparticulates for gene delivery. *Pharm. Res.* 2002; 19:382-390.
- [63] Alvarez RD, Sill MW, Davidson SA, Muller CY, Bender DP, DeBernardo RL *et al.* A phase II trial of intraperitoneal EGEN-001, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: a gynecologic oncology group study, *Gynecol. Oncol.* 2014; 133: 433-438.

- [64] Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:657-700.
- [65] Marmor M, Sheppard HW, Donnell D, Bozeman S, Celum C, Buchbinder S *et al.* HIV Network for Prevention Trials Vaccine Preparedness Protocol Team. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001; 27(5):472-81.
- [66] Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996; 382(6593):722-5.
- [67] Hütter G1, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K *et al.* Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009; 360(7):692-8.
- [68] Kaiser J. The gene editor CRISPR won't fully fix sick people anytime soon. Here's why. *Science.* 2016;
- [69] Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release.* 2017; 266:17-26.
- [70] Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Dejene BN, Gomez-Ospina N, Mantri S *et al.* Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans. *bioRxiv.* 2018; 1-15
- [71] Wilson JM, Lessons Learned From The Gene Therapy Trial For Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *Mol Genet Metab.* 2009; 96, 151-157.