



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria João Gomes Martins Correia de Almeida

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Designer Nucleases: Gene-Editing Therapies using CCR5 as an emerging target in HIV” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Dina Lopes, da Dra. Isabel Folhas e da Professora Doutora Ana Miguel Matos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Maria João Gomes Martins Correia de Almeida

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Designer Nucleases: Gene-Editing Therapies using CCR5 as an emerging target in HIV” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dr.^a Dina Lopes, da Dr.^a Isabel Folhas e da Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Maria João Gomes Martins Correia de Almeida, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014201098, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Designer Nucleases: Gene-Editing Therapies using CCR5 as an emerging target in HIV” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 2 de setembro de 2019.

Maria João Gomes Martins Correia de Almeida

(Maria João Gomes Martins Correia de Almeida)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, aos meus Super-Pais, por serem uns verdadeiros exemplos de vida e, indiscutivelmente, os meus melhores amigos. Devo-vos estes 5 anos de curso e tudo aquilo que sou hoje. Obrigada por me deixarem sonhar, acreditar e ser feliz.

Aos meus avós, pelos sorrisos, palavras de conforto e por estarem sempre presentes. Sem vocês, nada teria sido o mesmo.

Ao Pinheiro, à Sara, à Sofia, à Rabaça, à Pinto, à Matias, à Vanessa e à Costa, por quase tudo, ou por tudo, na verdade. Serão sempre a família que escolhi.

Às amigas de sempre, Miguelinha, Inês, Constança e Adriana, pela compreensão em todas as minhas ausências e por, tantas vezes, terem aceitado ser a minha última prioridade. Obrigada por me completarem.

À minha orientadora Professora Doutora Ana Miguel Matos, por ser um exemplo de profissionalismo, excelência, disponibilidade e amizade. Mais que a orientação de uma simples monografia, consigo, tudo foi uma aprendizagem de vida. Um sincero agradecimento que, certamente, nunca será suficiente.

À Dr.^a Isabel Maria Fresco Folhas, pelo apoio e sobretudo pelos sábios e carinhosos conselhos. Na memória, “O comboio só passa uma vez na vida. Certificar-me-ei que entro nele.” A toda a equipa técnica, pela paciência, amabilidade, apoio e sublimidade na transmissão de conhecimentos. Um agradecimento especial à Dr.^a Nélia que, além de uma exímia profissional, é uma amiga que sempre me incentivou a ser mais e melhor.

À Dr.^a Dina Cordeiro Lopes e a todos os colaboradores da equipa da DAM do INFARMED, I. P., por me integrarem, confiarem no meu trabalho e me impulsionarem a ir sempre mais longe.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por ter sido a minha segunda casa. Espero que o meu percurso seja sempre carinhosamente lembrado.

A Coimbra, por tudo o que vivi, pela saudade e intemporalidade.

Levo-te para sempre comigo!

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



**FARMÁCIA
ISABEL FOLHAS**

Orientadora: Dr.^a Isabel Maria Fresco Costa Folhas

ÍNDICE

1. Lista de Abreviaturas	6
2. Introdução.....	7
3. Análise SWOT	7
3.1 Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>).....	8
3.1.1 Localização da Farmácia e Horário de Funcionamento Alargado.....	8
3.1.2 Instalações funcionais e modernas	8
3.1.3 Integração na Equipa Técnica.....	10
3.1.4 Estruturação do Plano de Estágio	10
3.1.5 Inovação: equipamentos e serviços	12
3.2 Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	13
3.2.1 Sazonalidade do Estágio.....	13
3.3 Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	13
3.3.1 Participação em Formações Internas	13
3.3.2 Acompanhamento Farmacoterapêutico	14
3.4 Ameaças (<i>Threats</i>)	14
3.4.1 Medicamentos Esgotados.....	14
3.4.2 Espaços de venda de MNSRM.....	15
3.4.3 Estatuto de Medicamento Genérico.....	15
4. Conclusão.....	16
5. Bibliografia.....	17
6. Anexo I – Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado	19
7. Anexo II – Casos Práticos	23

I. Lista de Abreviaturas

AMI – Assistência Médica Internacional

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FIF – Farmácia Isabel Folhas

IPAC – Instituto Português da Acreditação

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PVPs – Preços de Venda ao Público

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

2. Introdução

Em Portugal, a presença do farmacêutico remonta ao ano de 1449. À data, conhecidos como boticários, as suas funções prendiam-se essencialmente com a preparação oficial de medicamentos ou substâncias medicamentosas. Todavia, acompanhando o progresso científico da última década, a atividade farmacêutica passou a centrar-se cada vez mais no cidadão e, paralelamente, em princípios sustentados no uso racional do medicamento e na garantia que este seja continuamente dispensado com o máximo de qualidade, eficácia e segurança.¹

Como relatado pela Ordem dos Farmacêuticos, “A Farmácia Comunitária é a face mais visível da profissão.” É o local onde, maioritariamente, se avizinha o primeiro contacto com o utente em questões de saúde.¹ Desta forma, sendo uma unidade imprescindível para o funcionamento completo, integrado e sustentável do Serviço Nacional de Saúde (SNS)², é na Farmácia Comunitária que o Farmacêutico se revela não só como um mero especialista do medicamento mas, essencialmente, como um agente promotor e defensor da saúde pública.³

Após quatro anos e meio de intensiva e pertinente formação teórica, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) ministrado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), possibilita aos seus estudantes ingressar numa última unidade curricular, o Estágio em Farmácia Comunitária, onde se prevê que uma abordagem prática e coerente articulada com a dinâmica real culminará não só na consolidação de conhecimentos adquiridos mas, sobretudo, na sua correta e cuidada aplicação em prol da saúde e bem-estar da comunidade. Mais que um exame final, esta experiência, enquanto estudantes, permite adquirir ideais e valores fundamentais para que, mais tarde, nos tornemos Farmacêuticos pautados por uma relação secular de disponibilidade, confiança e proximidade ao utente mas, maioritariamente, pela forte dedicação e competência profissional.

O presente relatório pretende retratar o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária por mim privilegiadamente experienciado, o qual teve início a 29 de abril e posterior conclusão a 29 de julho de 2019, com uma duração total de 670 horas, na Farmácia Isabel Folhas em Coimbra, sob atenta orientação da Dr.^a Isabel Maria Fresco Costa Folhas.

3. Análise SWOT

Tal como referido nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”,⁴ o subsequente relatório encontra-se na forma de análise SWOT, um acrónimo das palavras de origem inglesa *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*. Apesar de desenvolvido nos anos 60 num contexto empresarial,⁵ este instrumento possibilita

uma avaliação crítica da minha prestação e experiência profissional enquanto estagiária integrada na equipa da Farmácia Isabel Folhas, através de um processo de análise profunda e fundamentada em duas grandes dimensões: a interna, maximizando os pontos fortes e contemplando, mas nunca negligenciando, os pontos fracos para a minha formação; a externa, enaltecendo as oportunidades concedidas e as ameaças sentidas no decorrer desta etapa.

3.1 Pontos Fortes (*Strenghts*)

3.1.1 Localização da Farmácia e Horário de Funcionamento Alargado

A Farmácia Isabel Folhas (FIF) encontra-se localizada na Solum, um Bairro da freguesia de Santo António dos Olivais da cidade de Coimbra e, mais concretamente, na Rua Carolina Michaellis onde abriu portas em 1969 como a antiga “Farmácia Solum”.⁶ Tratando-se de uma farmácia com história e de localização estratégica, atualmente a FIF apresenta-se como uma farmácia de passagem – para todos os utentes ocasionais a frequentar o Alma Shopping, o Atrium Solum ou até mesmo o Estádio Cidade de Coimbra – e, essencialmente, como uma farmácia local – para os utentes habituais e fidelizados da zona envolvente, quer sejam residentes e/ou familiares de alunos a frequentar as várias instituições de ensino público nas redondezas. Neste contexto, tive sempre a oportunidade de contactar com diferentes tipos de utentes, de diferentes faixas etárias, estratos socioeconómicos e, conseqüentemente, distintos quadros clínicos e necessidades terapêuticas.

O horário de funcionamento da FIF nos dias úteis é de segunda a sexta-feira, entre as 9:00 e as 20:00 horas. Destaco a vantagem de ter estagiado até ao encerramento diário da farmácia, aos sábados (cujo horário é compreendido entre as 9:00 e as 13:00 horas) e nos serviços noturnos, onde tive a perceção das diferenças no afluxo dos utentes e das vastas realidades e problemáticas que iam surgindo.

3.1.2 Instalações funcionais e modernas

A FIF, após ter sido submetida a medidas de inovação quer de espaço físico quer de automatização e rendimento, adquiriu uma dimensão quatro vezes superior à da construção inicial e vê-se agora distribuída por dois pisos contemplando diferentes divisões, recentes e de enorme qualidade e funcionalidade.

No piso inferior destaco a sala de atendimento, ampla, de forma a favorecer a livre circulação de utentes e colaboradores e bastante iluminada, por luz natural e artificial, o que aumenta a atratividade do espaço. Aqui, numa primeira abordagem, existem bancos para uma espera confortável, maioritariamente destinados a utentes idosos e/ou de mobilidade

condicionada; um sistema de atribuição de senhas para facilitar o atendimento ordeiro (opção de atendimento geral, atendimento prioritário ou atendimento para aconselhamento de dermocosmética); dois ecrãs para visualização não só da relação número de senha/balcão mas também, de imagens e notícias farmacêuticas que captem a atenção do utente; uma mesa para distração infantil garantindo o entretenimento das crianças enquanto os familiares são tranquilamente atendidos; e, finalmente, 5 balcões de atendimento. A numeração dos balcões foi feita de forma coerente com o natural percurso dos utentes na farmácia, atribuindo-se o número 1 ao balcão mais próximo da porta de entrada e o número 5 ao balcão junto à porta de saída. Numa abordagem mais atenta e fazendo jus às zonas quentes da farmácia, é visível a utilização de material de *merchandising*, expositores e *testers* para dar a conhecer os produtos mais recentes e as promoções em vigor. Paralelamente, vigora uma grande área de exposição de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), inacessível ao público e com respetiva organização por patologia, bem como um conjunto vasto de lineares com produtos de dermocosmética separados por marca. Na parte inferior, por alguns impercetível, existem ainda gavetas com outros MNSRM ordenados por ordem alfabética e forma farmacêutica. De seguida, encontramos a sala do utente onde se procede à determinação de parâmetros bioquímicos, medição da tensão arterial, administração de injetáveis e serviço de troca de seringas. Sucedem, a casa de banho destinada aos utentes, a zona de receção de encomendas onde se procedeu à instalação do *robot* e a zona de exposição da tabela de divisão de tarefas, mensais e rotativas por todos os membros da equipa, de forma a diluir o trabalho e a responsabilidade sentida por todos.

No piso superior, encontramos imediatamente uma pequena zona de armazenamento para colocação de produtos de maiores dimensões ou de menor procura pelo utente, como dispositivos médicos em que se incluem fitas adesivas, pensos e uma vasta gama de contornos (pulso, joelho, perna, entre outros). Ao longo do corredor prevalecem dois escritórios, um para processos de gestão da farmácia e outro para aconselhamento nutricional ou formações internas; um laboratório para preparação de medicamentos manipulados; uma copa; uma casa de banho destinada aos colaboradores da FIF; e, por último, um grande armazém com estantes rotativas e portas de vidro onde a organização é cuidadosamente regida por tipo de produto (medicamento genérico, produtos de higiene oral, medicamento de marca, entre outros) bem como, por prazo de validade, vigorando consistentemente a regra “*first expired, first out*” (os produtos com menor prazo de validade são os primeiros a sair) para evitar quebras de *stock* desnecessárias.

3.1.3 Integração na Equipa Técnica

A FIF data de um longo histórico de receção de estagiários, demonstrando continuamente um elevado grau de respeito, consideração e simpatia no seu acolhimento. Ao longo do meu percurso enquanto estagiária, a constante disponibilidade por parte de toda a equipa revelou-se essencial na minha integração, autoconfiança e aprendizagem. A predisposição por um ensino construtivo por parte de qualquer colaborador, no qual me sentisse valorizada e apoiada, potenciou a superação de obstáculos e a evolução e aperfeiçoamento das tarefas por mim realizadas. Na FIF, com uma incansável equipa de 8 colaboradores, graças aos seus longos anos de experiência e marcado profissionalismo, aprendi muito a nível teórico e prático. Não obstante, aprendi que para o sucesso pleno são fundamentais qualidades como a amizade, humildade e entreatada. Podia ser a “Super Mulher”, mas convosco entendi que as equipas é que serão sempre os verdadeiros heróis. Por tudo, estarei sempre eternamente grata.

3.1.4 Estruturação do Plano de Estágio

A FIF destaca-se pelo facto de submeter os seus estagiários ao verdadeiro e intensivo ritmo de trabalho de um farmacêutico comunitário, acabando por nos fornecer uma preparação prática inigualável e altamente diferenciadora. Considero que todo o plano de estágio estava altamente bem organizado e delineado por forma a garantir que viesse a desempenhar uma série de funções essenciais, como parte integrante da equipa:

- O Atendimento ao Público, talvez a função mais desafiante de todo o estágio, iniciou-se calmamente com um carácter meramente observacional, para que me fosse ambientando com a imprevisibilidade no ato da dispensa ao público. Posteriormente, comecei a efetuar atendimentos acompanhada, com o intuito de me familiarizar com o funcionamento do Sifarma 2000[®] e com todas as suas potencialidades. Nesta fase, os meus erros foram reconhecidos e gradualmente ultrapassados. Rapidamente fui ganhando alguma confiança e interligando conhecimentos teóricos de Farmacologia, Farmácia Clínica e Indicação Farmacêutica, aperfeiçoando, com segurança, o meu aconselhamento de dia para dia. Neste contexto, a interação com o público fomentou a melhoria de competências como a autonomia, destreza informática, espírito crítico e ajuste da linguagem técnica às diferentes realidades com que me deparava;

- A Gestão de Encomendas e Armazenamento de Produtos, onde se rececionava, conferia e criava encomendas, com a respetiva supervisão do farmacêutico responsável. Só após verificação e atualização do prazo de validade dos produtos no sistema, confirmação dos Preços de Venda ao Público (PVPs) e confirmação do número de embalagens e do valor total

da encomenda é que se procedia ao respetivo armazenamento dos produtos rececionados (exceção feita aos medicamentos com condições especiais de conservação, que de forma a manter a sua estabilidade e qualidade eram desde logo rececionados e armazenados). Para além disto, quando se evidenciava alguma irregularidade como produtos danificados, faturados e não enviados ou não faturados e enviados, procedia-se de imediato à sua reclamação e/ou devolução;

- A Gestão Comercial, revelou-se uma tarefa essencial para a valorização da Farmácia. Por um lado, a gestão do *stock* dos diferentes produtos e dos respetivos prazos de validade exige uma atenção minuciosa às necessidades dos utentes, salvaguardando a perda de vendas por falta de produtos e a perda de produtos por rutura de *stock*. Nesta função, vê-se como fundamental o criterioso sentido de escolha dos produtos em função dos desejos da população nas diferentes épocas do ano, culminando numa maior rentabilidade da farmácia. Por outro lado, a escolha de fornecedores e o estabelecimento de contratos cujas condições e descontos sejam mais vantajosos, exige uma procura incessante pelas melhores oportunidades;

- A Preparação de Medicamentos, onde tive a oportunidade de me inteirar com Preparações Extemporâneas, nomeadamente alguns antibióticos que são comercializados sob a forma de pó liofilizado e que, aquando da sua administração, exigem ser transformados na forma de suspensão oral com recurso a uma simples adição de água purificada. Durante o período de estágio, para prevenir erros de dosagem resultantes de uma diluição mal efetuada, foi-me sempre solicitada a preparação destes medicamentos no momento da sua dispensa. Em concordância, e apesar de apresentar cada vez menos representatividade em virtude da evolução da Indústria Farmacêutica, pude ainda contactar com a preparação de um Medicamento Manipulado, a qual se justifica em casos específicos de personalização da terapêutica, de preenchimento de lacunas terapêuticas ou quando a forma farmacêutica em questão não é comercializada. Considero esta tarefa essencial, na medida em que me permitiu pôr em prática conhecimentos previamente adquiridos em Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. Enalteço, por conseguinte, a preparação de um creme constituído por 30 g de Cutivate (propionato de flicasona) creme, um corticoesteróide tópico para alívio das manifestações inflamatórias e pruriginosas das dermatoses,⁷ e 30 g de Nizoral (cetoconazol) creme, de atividade antimicótica para alívio de prurido e tratamento de infeções da pele provocado por fungos ou leveduras,⁸ cuja ficha de preparação vem demonstrada no ANEXO I. Destaco que, sendo este um medicamento destinado a suprimir as necessidades especiais de um doente individualizado, é no farmacêutico que recai a responsabilidade da correta

interpretação da receita, seleção de matérias-primas, processo de manipulação com garantia da qualidade, acondicionamento e rotulagem.

3.1.5 Inovação: equipamentos e serviços

A grande dimensão da FIF, aliada à proeminente competitividade do mercado farmacêutico, obrigou ao desenvolvimento e adequação de estratégias com o objetivo de garantir a boa organização e execução de tarefas segundo procedimentos bem definidos, potenciando o rendimento de todos os processos internos da farmácia. Desta feita e com a pretensão de ter um estabelecimento de valor acrescentado, foi implementado um modelo de dupla certificação para gestão de qualidade disponibilizado, quer pela norma NP EN ISO 9001, garantindo a acreditação da FIF por parte do Instituto Português da Acreditação (IPAC), quer pelo modelo das Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária, disponibilizado pelo Conselho Nacional de Qualidade.⁹ Apesar da comprovada qualidade ser já, só por si, um fator de distinção e singularidade, a FIF revela a incessante procura pela inovação através da implementação de novos equipamentos e serviços.

No que diz respeito aos equipamentos, destaco a utilização do CashGuard, do *robot* modular de farmácia CUBE+ e do PharmaShop24. O CashGuard revelou-se uma solução de gestão altamente vantajosa a uma série de níveis: na segurança, decrescendo a probabilidade de realizar trocos errados e o risco de roubo; na produtividade, garantindo o foco no utente e na venda e não na contagem minuciosa do dinheiro; e na poupança de tempo, em que um pagamento mais rápido vem interrelacionado com um atendimento conciso e rigoroso.¹⁰ O *robot* modular CUBE+ existente na FIF tem a capacidade para armazenar cerca de 14000 embalagens, maioritariamente Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), e possibilita a otimização do espaço da farmácia e a automatização de processos como entrada de encomendas, reposição e cedência de medicamentos. A única desvantagem associada são as situações em que se verifica o bloqueio do *robot*, levando à paragem do sistema de cedência dos medicamentos e conseqüente perda de acuidade no atendimento em curso. Nesta fase, há a necessidade de entrar na área de armazenamento, remover a caixa do medicamento que está na causa da obstrução e reiniciar todo o sistema.¹¹ Por último, o PharmaShop24, um expositor existente no exterior da farmácia e que se destina à dispensa de produtos não sujeitos a receita médica e não medicamentosos, aquando da introdução do valor monetário correspondente.¹² Este equipamento possibilita não só o acesso a produtos de saúde fora do horário de funcionamento das farmácias, mas também, a salvaguarda da privacidade do utente, garantindo que o produto seja adquirido de forma independente.

No que concerne aos serviços de saúde pública em vigor, enalteço a ValorMed, o programa de troca de seringas e a reciclagem de radiografias. A ValorMed, uma sociedade sem fins lucrativos tutelada pela Agência Portuguesa do Ambiente, foi criada em 1999 e subsequentemente implementada na FIF com um objetivo último, salvaguardar a sustentabilidade nas etapas finais do ciclo de vida com a recolha de embalagens e medicamentos fora do prazo de validade, para posterior tratamento dos mesmos.¹³ O programa de troca de seringas, iniciado em 1993, pretende prevenir o contágio de doenças infecciosas (como o VIH e Hepatites B e C) em utilizadores de drogas injetáveis,¹⁴ pressupondo a cedência gratuita de *kits* novos e a recolha de seringas usadas, na sala do utente. Por fim, evidencio o Programa de Reciclagem de Radiografias, dinamizado pela Assistência Médica Internacional (AMI) em colaboração com as farmácias portuguesas. A recolha de radiografias antigas e sem valor para diagnóstico na FIF possibilita o seu subsequente tratamento nos armazéns da AMI em que é feita a recuperação dos sais de prata contidos nas radiografias. Consequentemente, o dinheiro resultante da venda desta matéria-prima reverte para ações dinamizadas por esta organização em território português.¹⁵

3.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1 Sazonalidade do Estágio

Como referido anteriormente, o meu estágio decorreu entre 29 de abril de 2019 e 29 de julho de 2019, compreendendo maioritariamente meses pertencentes à estação da primavera. Por conseguinte, as necessidades dos utentes prenderam-se com a procura de protetores solares e cremes pós-solares, repelentes de insetos, anti-histamínicos e descongestionantes nasais, uma vez que esta é uma fase marcada pelo calor e alergias. Neste sentido, foi-me impossível contactar de forma mais precisa com produtos vendidos nas estações mais frias do ano, nomeadamente antigripais, pastilhas para a dor de garganta, xaropes para a tosse, entre outros.

3.3 Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1 Participação em Formações Internas

Sendo a formação técnico-científica uma constante no exercício da atividade farmacêutica, a FIF possibilitou-me a oportunidade de participar em diversas formações internas facultadas por delegados de informação médica oriundos de diferentes laboratórios, de forma a apreender novos conhecimentos e a consolidar outros já adquiridos. Estas eram geralmente

de curta duração, durante o período de funcionamento da farmácia, em grupos de duas a três pessoas, e destinavam-se essencialmente à apresentação das indicações terapêuticas, vantagens e técnicas de venda para os produtos já comercializados por cada marca, ou prestes a serem lançados no mercado. Neste contexto, tive a oportunidade de experienciar cerca de 6 formações internas, desde a área da dermocosmética à dos suplementos alimentares, o que em muito me auxiliou no aconselhamento e atendimento ao público.

3.3.2 Acompanhamento Farmacoterapêutico

A FIF pauta-se pela afluência de um elevado número de utentes fidelizados, maioritariamente residentes, estudantes e trabalhadores nas redondezas, possibilitando ao farmacêutico ter um papel ativo e interventivo no seu seguimento farmacoterapêutico. Neste sentido foram úteis duas condicionantes: a ferramenta “Histórico” presente na ficha de utente do Sifarma 2000[®], que sempre me possibilitou consultar a medicação habitual para cada caso em particular, garantindo um aconselhamento fidedigno e informado; e a medição de parâmetros bioquímicos (como a glicémia e o colesterol) e antropométricos (cálculo do Índice de Massa Corporal) de forma a aconselhar alterações do estilo de vida e/ou alertar para a necessidade do utente ser encaminhado para o médico.

Apesar de toda a insegurança inicial, é da nossa responsabilidade enquanto futuros profissionais de saúde, assegurar que todos os utentes ficam devidamente inteirados e esclarecidos relativamente à medicação dispensada, quer ao nível de possíveis efeitos secundários, quer ao nível da sua posologia e particularidades de toma, apelando consistentemente à adesão terapêutica e ao uso racional do medicamento. Desta forma, apresento no Anexo II, três exemplos de casos reais com os quais me deparei, por forma a mostrar a minha ponderada intervenção nas necessidades terapêuticas apresentadas.

3.4 Ameaças (*Threats*)

3.4.1 Medicamentos Esgotados

Registaram-se ocasiões em que me confrontei com o desgosto e frustração dos utentes perante a impossibilidade de lhes ceder os medicamentos prescritos e já habituais, por se encontrarem esgotados e sem previsão de chegada à farmácia.¹⁶ Recordo o caso da Aspirina GR[®] 100 mg, comprimidos gastrorresistentes contendo a substância ativa ácido acetilsalicílico, indicada como antiagregante plaquetário em situações clínicas onde existe o risco de formação de coágulos nos vasos sanguíneos, nomeadamente em certas doenças cardiovasculares.¹⁷ O carácter crónico aliado à toma deste medicamento e a sua falta no *stock* das farmácias a nível

nacional, originou uma grande ansiedade e preocupação nos utentes e, conseqüentemente, em toda a equipa técnica. Muitos foram os esforços dos colaboradores da FIF na esperança de suprimir as necessidades do maior número possível de utentes, tentando incessantemente garantir alternativas terapêuticas igualmente viáveis até à reposição da normalidade.

3.4.2 Espaços de venda de MNSRM

O Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto veio legalizar a venda de MNSRM fora das farmácias, dado que o Governo reconheceu benefícios proporcionados aos consumidores quer em termos de acessibilidade, facultada pelo aumento do número de pontos de venda, quer em termos de preço.¹⁸ De facto é notório que, sobretudo nas grandes superfícies, estes locais de venda se têm vindo a multiplicar, ameaçando inevitavelmente a profissão farmacêutica tanto por motivos económicos como pela banalização do estatuto do medicamento. Para além do acentuado impacto na viabilidade económica da farmácia, já que as grandes superfícies ao efetuarem um grande volume de compras possibilitam a implementação de preços de venda ao público inferiores, há ainda um apelo irracional e despreocupado à automedicação, muitas vezes irresponsável, sem que seja feito o adequado acompanhamento farmacoterapêutico ao utente para que o medicamento seja tomado com a maior pertinência e segurança.

3.4.3 Estatuto de Medicamento Genérico

A definição de medicamento genérico, estipulado pelo Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto, assevera que estes têm “a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica, dosagem e a indicação terapêutica que o medicamento original, de marca, que serviu de referência”.¹⁹ Apesar de apresentarem comprovadamente a mesma segurança e eficácia, traduzida na demonstração de bioequivalência através de estudos de biodisponibilidade, muitos são os utentes que permanecem reticentes quanto à sua dispensa. Este é, de facto, um tema crucial e sensível que exige uma maior atenção por parte da comunidade farmacêutica para que se desmistifiquem falsos receios e para que se evite, ao máximo, que os utentes, por indisponibilidade da marca de referência, prefiram não iniciar a terapêutica medicamentosa em alternativa a fazê-lo com recurso a uma marca genérica igualmente confiável e eficaz.

4. Conclusão

Terminado o estágio curricular na Farmácia Isabel Folhas, reconheço que estes três meses, graças a uma equipa de enorme singularidade e profissionalismo, resultaram numa contínua preparação para a excelência que, a par de uma evolução repleta de aprendizagens, me permitem agora encarar o futuro profissional com um maior otimismo e segurança. Foram todas as dificuldades, receios e incertezas, mas sobretudo todos os sorrisos, momentos de conquista e demonstrações de gratidão nos pequenos gestos que hoje me fazem ver com satisfação o percurso que dou por concluído.

Depois desta fase no meu historial académico, sustento que um farmacêutico competente será para sempre um eterno estudante, um profissional de saúde preocupado, capaz de ouvir e responder mas, acima de tudo, de se enriquecer técnico-cientificamente na esperança de satisfazer com a maior plenitude as necessidades do utente e da comunidade. Mais que qualquer outra unidade curricular, o Estágio em Farmácia Comunitária prepara inquestionavelmente os alunos do MICF para o futuro exercício da profissão farmacêutica e, como tal, congratulo a FFUC por esta enorme oportunidade defendendo a sua constante inclusão nos anos letivos que se avizinham.


Levo do estágio curricular uma experiência incontestavelmente gratificante, e da Farmácia Isabel Folhas um exemplo de excelência, qualidade e amizade, do qual nunca me esquecerei.

5. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **Farmácia Comunitária** [Acedido a 2 de agosto de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>
2. ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE ESTUDANTES DE FARMÁCIA. **Farmácia Comunitária** [Consultado a 2 de agosto de 2019]. Disponível na internet: <http://apef.pt/farmacia-comunitaria/>
3. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos** [Consultado a 2 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>
4. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA. **Normas Orientadoras do Estágio Curricular**. (2019).
5. INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO EDUCACIONAL. **A Maneira Mais Simples de Entender Análise SWOT** [Consultado a 2 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://seculoxximinas.com.br/fgv/blog/planejamento/a-maneira-mais-simples-de-entender-analise-swot>
6. FARMÁCIA ISABEL FOLHAS. **Quem Somos** [Consultado a 2 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.farmaciaisabelfolhas.pt/index.php/sobre-nos/>
7. INFARMED, I.P. **Resumo das Características do Medicamento Cutivate® 0,5 mg/g, Creme** [Consultado a 3 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2273&tipo_doc=fi
8. INFARMED, I.P. **Resumo das Características do Medicamento Nizoral® 20 mg/g, Creme** [Consultado a 3 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6151&tipo_doc=fi
9. SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE. **ISO 9001 – Certificação, Sistemas de Gestão da Qualidade** [Consultado a 3 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.sgs.pt/pt-pt/health-safety/quality-health-safety-and-environment/quality-management-systems/iso-9001>
10. CASHGUARD PORTUGAL. **Vantagens** [Consultado a 3 de agosto de 2019]. Disponível na internet: <http://www.cashguard.pt>
11. EXCLUSIVASIGLESIAS. **Robô de Farmácia CUBE** [Consultado a 3 de agosto de 2019]. Disponível na internet: <http://www.exclusivasiglesias.com/pt-pt/productos/p/1086/rob%C3%B4-de-farm%C3%A1cia-cube>

12. PHARMASHOP24. **Modular System** [Consultado a 3 de agosto de 2019]. Disponível na internet: <https://www.pharmashop24.com/modules/>
13. VALORMED. **Quem Somos** [Consultado a 4 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
14. SERVIÇOS PARTILHADOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa de Troca de Seringas** [Consultado a 4 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://spms.minsaude.pt/2014/05/programa-troca-de-seringas-relatorio-anual-2013/>
15. FUNDAÇÃO DE ASSISTÊNCIA MÉDICA INTERNACIONAL. **Reciclagem de Radiografias** [Consultado a 4 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://ami.org.pt/blog/21a-campanha-reciclagem-radiografias/>
16. SILVEIRA, J. - **A Verdade sobre os Medicamentos “Esgotados”**. Público. 51453 (2012) 52.
17. INFARMED, I.P. **Resumo das Características do Medicamento Aspirina GR® 100 mg, Comprimidos Gastrorresistentes** [Consultado a 4 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6151&tipo_doc=fi
18. Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de agosto de 2005 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 156 de 16 de agosto de 2005.
19. Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto de 2006 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 167 de 30 de agosto de 2006.
20. PARANIX. **Sempre Consigo Contra os Piolhos** [Consultado a 5 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.paranix.eu/pt>
21. ROTER. **Roter Cystiberry®** [Consultado a 5 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.roter.pt/nl/roter-cystiberry%C2%AE>
22. GUAY, D. R. P. - **Cranberry and Urinary Tract Infections**. Drugs. 69 (2009) 775-807.
23. INFARMED, I.P. **Resumo das Características do Medicamento Imodium Rapid® 2 mg, Comprimidos Orodispersíveis** [Consultado a 5 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=rcm
24. INFARMED, I.P. **Resumo das Características do Medicamento UL-250® 250 mg, Cápsulas** [Consultado a 5 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8813&tipo_doc=f

Verificação

Ensaio efectuado	Especificação	Resultado		Rubrica do Operador
		Conforme	Não Conforme	
1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS				
1.1 Cor (verificar conformidade com a especificação)	Branca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.2 Odor (verificar conformidade com a especificação)	Inodora	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.3 Aspecto (verificar conformidade com a especificação)	Homogéneo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2 CONFORME COM A DEFINIÇÃO DA MONOGRAFIA DA FARMAC. PORT.		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3 QUANTIDADE Terrar previamente o recipiente de dispensa e, em seguida, pesar com o respectivo conteúdo		60 g (\pm 5%)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Supervisor:		Aprovado <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> Rejeitado
Data: 17 /07/2019				
Embalagem				
Embalar o creme em recipiente opaco (FP VII)				
Capacidade do Recipiente: 90 g				
Material de Embalagem	Data de Aquisição ou nº da Factura		Origem	
Caixa plástica 90g	8204110271		Plural	
				Operador:
Nome, morada e telefone do doente				
Nome do médico prescriptor				
ANOTAÇÕES				
Rubrica  DT:				Data 17/07/2019

Cálculo do preço de venda										
Matérias-primas:										
Matérias-primas	Embalagem existente em armazém		Preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/ IVA)		Quantidade a usar	Factor multiplicativo	Preço da matéria-prima utilizada na preparação			
	Quantidade adquirida	Preço de aquisição (s/ IVA)	Quantidade unitária	Preço						
Cutivate creme				3,73	X 1	X	=	3,73		
Nizoral creme				4,87	X 1	X	=	4,87		
					X	X	=			
					X	X	=			
					X	X	=			
					X	X	=			
Subtotal A								€ 8,60		
HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:										
	Forma Farmacêutica	Quantidade	F (€)	Factor Multiplicativo		Valor				
Valor referente à quantidade base	Creme	60 g	5,03	X	9	=	45,27			
Valor adicional				X	X	=				
Subtotal B								€ 45,27		
MATERIAL DE EMBALAGEM:										
Materiais de embalagem		Preço de aquisição (S/ IVA)	Quantidade	Factor Multiplicativo		Valor				
Caixa de plástico		0,51€	1	X	1,2	=	0,61€			
				X		=				
				X		=				
Subtotal C								€ 0,61		
PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:					(A +B +C) x 1,3		70,82			
					IVA		4,25			
					D		€ 75,07			
OUTROS CUSTOS INCORPORADOS:										
Rótulo (s)		Preço de Aquisição (C/ IVA)	Quantidade	Valor	Subtotais					
Dispositivos Auxiliares										
Subtotal E										
PREÇO FINAL D + E								€75,07		
Operador:					Supervisor:					
Rubrica de DT:					Data 17/07/2019					

PRAZO DE UTILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO:

Condições de conservação: O creme é estável, quando conservado à temperatura ambiente em recipiente opaco bem fechado.

Operador:

Prazo de Utilização: 30 dias

Operador:

Rotulagem

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito de seguida.
2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada.

 <p>Direcção Técnica: Isabel Maria Fresco Costa Folhas R. Carolina Michaliefs, 20 D – F - 3030-324 COIMBRA Telef. 239404543 Fax 239780829</p>	<p>Médico Prescritor: [REDACTED]</p>
	<p>Identificação do doente: [REDACTED]</p>
<p>DENOMINAÇÃO DO MEDICAMENTO Cutivec (propionato de fluticasona) creme + nizoral (cetoconazol) creme</p>	
<p>100 g de creme contém 1 g de cetoconazol + 23 mg de propionato de fluticasona</p>	<p>Data de Preparação: 17/07/2019</p>
<p>Quantidade dispensada: 60 g</p>	<p>Posologia: Prazo de utilização: 30 dias Conservar à temperatura ambiente em embalagem bem fechada Mantenha fora do alcance das crianças Nº Lote: 014/19</p>
<p>Medicamento Uso externo</p>	<p>Operador: _____</p>
<p>Preço: € 75,07</p>	

Unidade	Kg	hg	dag	g	cg	mg
FACTOR	1,0	10	100	1.000	10.000	100.000

Formas Farmacéuticas Semi-sólidas	Pomadas propriamente ditas, géis, pomadas obtidas por incorporação de substâncias activas em sistemas pré-preparados industrialmente.	Até 100 g - F x 3	Cada g adicional - F x 0,01
	Pastas	Até 100 g - F x 4,5	Cada g adicional - F x 0,01
	Cremas	Até 100 g - F x 9	Cada g adicional - F x 0,015
Formas Farmacéuticas Líquidas não estériles	Soluções, formas líquidas obtidas por incorporação de substâncias activas em sistemas pré-preparados industrialmente	Até 100 g / 100 ml - F x 3	Cada g / ml adicional - F x 0,005
	Xaropes	Até 100 g / 100 ml - F x 9	Cada g / ml adicional - F x 0,005
	Suspensões	Até 100 g / 100 ml - F x 4,5	Cada g / ml adicional - F x 0,007
	Emulsões	Até 100 g / 100 ml - F x 9	Cada g / ml adicional - F x 0,013
Formas Farmacéuticas Sólidas	Papéis medicamentosos	Até 10 unid. - F x 6	Cada papel adicional - F x 0,1
	Cápsulas	Até 10 unid. - F x 4,5	Cada papel adicional - F x 0,01
	Pó compactos	Até 100 g - F x 3	Cada g adicional - F x 0,003
	Granulados	Até 100 g - F x 4,5	Cada g adicional - F x 0,013
	Comprimidos	Até 10 cp. - F x 6	Cada cp. adicional - F x 0,1
	Supositórios e óvulos	Até 10 unid. - F x 6	Cada sup. / óv. adicional - F x 0,01
Formas Farmacéuticas Líquidas estériles	Soluções estériles	Até 100 g / 100 ml - F x 4,5	Cada g / ml adicional - F x 0,005
	Soluções injetáveis	Até 10 amp. - F x 6	Cada amp. adicional - F x 0,1
	Suspensões injetáveis	Até 10 amp. - F x 6,5	Cada amp. adicional - F x 0,14

Rubrica de DT:

Data 17/07/2019

7. Anexo II – Casos Práticos

CASO I

A utente A, do sexo feminino e com cerca de 40 anos, dirigiu-se à farmácia em estado apreensivo, queixando-se que a filha apresentava uma constante “comichão na cabeça”. Referiu a sua suspeita relativa a um provável surto de piolhos já que, após contacto com outros familiares, se tinha deparado com a persistência deste sinal noutras crianças da turma. Inicialmente perguntei o comprimento do cabelo da filha, na medida em que cabelos compridos obrigam à dispensa de duas embalagens de champô de forma a garantir o máximo de eficácia do tratamento. Perante a resposta “tem cabelo curto” aconselhei a utente a optar por um *pack* da marca Paranix® constituído por: Paranix® champô de tratamento contra lêndeas e piolhos, um pente metálico para remoção de piolhos e Paranix® champô de proteção.²⁰ Este último, tem uma ação 2 em 1, pelo que lava e protege simultaneamente. Desta forma, pode ser utilizado como um substituto do champô regular a cada dois a três dias, prevenindo eficazmente a instalação capilar de um surto de piolhos.

Inicialmente aconselhei a passagem no cabelo seco, madeixa a madeixa, desde o couro cabeludo até às pontas, do pente metálico anti-piolhos incluído na embalagem anteriormente descrita. Posteriormente, agitar a embalagem de Paranix® champô de tratamento antes de utilizar e aplicar quantidade suficiente e de forma uniforme no cabelo ainda seco. Alertei para a importância de cobrir todo o cabelo e couro cabeludo com uma camada espessa de produto, massajando bem desde as raízes até às pontas e com especial atenção à zona da nuca e atrás das orelhas, onde os piolhos e as lêndeas se tendem a aglomerar. Deixar atuar durante 15 minutos e pentear novamente o cabelo com o pente metálico para garantir a remoção dos piolhos e as lêndeas, agora já mortos. Adicionar água suficiente ao cabelo para a formação de espuma e enxaguar até não se verificarem resíduos de produto. O tratamento deve ser repetido 7 dias depois de forma a garantir que nenhuma lêndea esquecida se reproduza e desencadeie um novo surto. Como medida não farmacológica alertei para o uso do cabelo apanhado de forma a minimizar o contacto do cabelo da filha com o de outro colega possivelmente infetado.

CASO II

A utente B, do sexo feminino e com cerca de 50 anos, apresentou-se na farmácia com sintomatologia indicativa de uma infeção urinária, queixando-se de vontade frequente e inesperada em urinar, sem estar associada a dor e sem perda de sangue. Revelou que as infeções eram bastante frequentes e que tinha acabado de tomar antibiótico, prescrito pelo

médico, de forma a potenciar a recuperação de uma infecção passada. Sendo clara a vontade da utente em evitar uma nova infecção, aconselhei o dispositivo médico Roter Cystiberry®, constituído por 500 mg de extrato patenteado CranberryActive™ (Arando americano), indicado na prevenção das infeções urinárias, com a toma diária de uma cápsula, durante um mês.²¹ O seu principal mecanismo de ação consiste em inibir a adesão e a consequente formação de biofilmes pela bactéria *Escherichia coli* no epitélio urinário, o que impede a génese da infecção. Contudo, alertei a doente de que o produto não seria eficaz no caso de uma infecção já instalada, uma vez que o Arando não demonstra eficácia na remoção de biofilmes já formados.²² Reforcei que, caso a sintomatologia permanecesse e/ou piorasse, deveria consultar novamente um médico e, como medida não farmacológica, aconselhei a ingestão de, pelo menos, um litro e meio de água por dia.

CASO III

O utente C, do sexo masculino e com aproximadamente 30 anos, dirigiu-se à farmácia apressadamente queixando-se de episódios diarreicos que persistem há já 3 dias. Solicita-me uma solução urgente, alertando para a inconveniência da situação por motivos profissionais. Apesar da toma de fármacos antidiarreicos ser, numa primeira abordagem, desaconselhada, decidi garantir que o utente estava livre de apresentar outros sinais como febre, vómitos, dores de estômago e presença de sangue e/ou pus nas fezes. Na ausência de todos eles dispensei, com respetiva autorização de um farmacêutico, uma embalagem do MNSRM, Imodium Rapid®, comprimidos orodispersíveis com 2 mg de loperamida - um agente obstipante que diminui o peristaltismo propulsivo, aumentando o tempo de trânsito intestinal e a reabsorção de água.²³ Esclareci as particularidades inerentes à sua toma, explicando que deveria tomar imediatamente 2 comprimidos, seguidos de 1 comprimido após cada dejeção diarreica. Alertei para uma dose máxima diária de 4 comprimidos e uma duração máxima de tratamento de 48 horas. Por fim, enalteci as medidas não farmacológicas de hidratação e reposição regular de eletrólitos, recomendando ainda o suplemento alimentar probiótico UL-250® cápsulas constituído por *Saccharomyces boulardii*, com a toma de 1 cápsula, 3 vezes por dia, de forma a reestabelecer a flora intestinal.²⁴

PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES DO MEDICAMENTO



Orientadora: Dr.^a Dina Cordeiro Lopes

ÍNDICE

1. Lista de Abreviaturas	27
2. Introdução.....	28
3. Enquadramento do INFARMED, I.P.....	28
4. Direção de Avaliação de Medicamentos	29
5. Análise SWOT	29
5.1 Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>).....	30
5.1.1 Localização do INFARMED, I.P.	30
5.1.2 Acolhimento Inicial e Integração na Equipa de Trabalho.....	30
5.1.3 Ambiente Profissional na DAM-UMM.....	31
5.1.4 Competências Desenvolvidas e Tarefas Desempenhadas	31
5.2 Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	32
5.2.1 Fluxo Irregular de Trabalho com Sobrecarga dos Colaboradores.....	32
5.3 Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	33
5.3.1 Assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos	33
5.3.2 Entidade Máxima da Regulamentação do Medicamento em Portugal.....	34
5.4 Ameaças (<i>Threats</i>)	34
5.4.1 Falha dos Recursos Tecnológicos	34
5.4.2 Deslocalização do INFARMED, I.P. para o Porto	34
6. Conclusão.....	35
7. Bibliografia.....	36
8. Anexo I – Organograma do INFARMED, I.P.	37

I. Lista de Abreviaturas

AIM - Autorização para Introdução no Mercado

CAM - Comissão de Avaliação de Medicamentos

CESP - *Common European Submission Portal*

CTS - *Communication and Tracking System*

DAM - Direção de Avaliação de Medicamentos

DRHFP - Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais

EMA - *European Medicines Agency*

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FI - Folheto Informativo

GestProc - Base de dados de Gestão de Processos

GIMED - Base de dados de Gestão de Informação de Medicamentos

GPRen - Base de dados de Gestão de Processos de Renovação

INFARMED, I.P. - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MUH - Medicamentos de Uso Humano

QRD - *Quality Review of Documents*

RCM - Resumo das Características do Medicamento

SMUH-ALTER - Plataforma de Submissão de Pedidos de Alteração do Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UAC - Unidade de Avaliação Científica

UEC - Unidade de Ensaio Clínicos

UIM - Unidade de Introdução no Mercado

UMM - Unidade de Manutenção no Mercado

2. Introdução

O Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos, segundo o Decreto-Lei nº 288/2001 de 10 de novembro, preconiza que o ato farmacêutico deverá sempre pautar-se por um elevado grau de responsabilidade, qualidade, solidariedade e autonomia técnica e científica. O farmacêutico, com o maior zelo, diligência e competência, deve potenciar o alcance dos objetivos da política de saúde, comprometendo-se a desempenhar ativamente as diversas funções ligadas ao ciclo de vida do medicamento.¹ Ainda que, como especialista, esteja altamente focado numa abordagem terapêutica caracterizada pela dispensa racional, eficaz e segura, este tem vindo a destacar-se noutros domínios alheios independentes da Farmácia Comunitária e que, a meu ver, constituem uma mais-valia para o setor da saúde e, em particular, para toda a comunidade.

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) possibilita aos alunos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), em adição ao estágio curricular obrigatório em Farmácia Comunitária, a realização de um segundo estágio igualmente inserido no plano de estudos, numa outra área do âmbito farmacêutico – Farmácia Hospitalar, Indústria, Distribuição, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED, I.P.) – cuja opção dependerá, essencialmente, dos seus interesses e gostos pessoais. Nesta conformidade, desde muito cedo que decidi optar pela Direção de Avaliação do Medicamento no INFARMED, I.P., não só pela preponderância da área dos Assuntos Regulamentares no mercado farmacêutico global, como também pela possibilidade de adquirir uma visão holística e diferenciadora do circuito do medicamento enquanto parte integrante de uma das mais conceituadas agências regulamentares a nível europeu.

O presente relatório pretende retratar o Estágio Curricular em Assuntos Regulamentares do Medicamento, por mim autónoma e privilegiadamente experienciado, o qual teve início a 7 de janeiro de 2019 e posterior conclusão a 29 de março de 2019, com a duração de 3 meses, no INFARMED I.P., sob atenta orientação da Dr.^a Dina Cordeiro Lopes.

3. Enquadramento do INFARMED, I.P.

O INFARMED, I.P. é o instituto público português de património próprio e autonomia administrativa e financeira responsável pela regulação, supervisão e fiscalização da qualidade, eficácia e segurança dos setores associados aos medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos, por forma a assegurar o seu contínuo acesso por parte dos profissionais de saúde e dos cidadãos. Nesta Autoridade Nacional, não se procede à produção, distribuição ou venda de medicamentos, já que tais funções só podem ser desempenhadas exclusivamente por entidades autorizadas para o efeito. Desta forma, o INFARMED, I.P. pretende apenas

regular a avaliação, autorização, disciplina, inspeção e controlo de produção, distribuição, comercialização e utilização do medicamento.²

Com jurisdição sobre todo o território nacional e sob tutela do Ministério da Saúde, o INFARMED, I.P. encontra-se sediado no Parque de Saúde de Lisboa onde, com um elevado nível de organização, se divide em cinco órgãos e em treze unidades orgânicas, das quais oito têm funções de negócio e cinco funções de suporte (Anexo I).³

4. Direção de Avaliação de Medicamentos

A Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM), atualmente dirigida pela Dr.^a Marta Marcelino, inclui-se numa das unidades orgânicas com funções de negócio e é constituída por quatro grandes unidades: a Unidade de Ensaios Clínicos (UEC), a Unidade de Introdução no Mercado (UIM), a Unidade de Avaliação Científica (UAC) e a Unidade de Manutenção no Mercado (UMM).⁴ Sob direção do Dr. Rui Vilar, o meu estágio curricular enquadrou-se na UMM que, ao atuar na fase posterior à concessão de Autorização para Introdução no Mercado (AIM), se responsabiliza pela gestão de processos de Alterações, Renovações e Revogações de Medicamentos de Uso Humano (MUH) já autorizados, de forma a assegurar a sua manutenção no mercado farmacêutico.⁴ De acordo com o tipo de procedimento dos processos em tratamento e a posição que Portugal ocupa enquanto estado membro europeu, dentro da UMM os colaboradores são organizados em diferentes equipas de trabalho capazes de albergar um vasto leque de funções. Por conseguinte, durante a permanência na DAM-UMM, fui enquadrada na equipa dedicada maioritariamente à gestão das alterações aos termos da AIM submetidas para medicamentos aprovados por Procedimento Nacional e que, tal como seria expectável, só poderão ser disponibilizados e comercializados em Portugal Continental.

5. Análise SWOT

Tal como referido nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”,⁵ o presente relatório encontra-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), em que pretendo analisar criticamente a integração da aprendizagem teórica adquirida na área dos Assuntos Regulamentares à realidade profissional vivenciada durante o estágio curricular no INFARMED, I.P.. Desta forma, tirando partido da componente interna fornecida por este instrumento de análise, realço os Pontos Fortes que valorizaram o meu estágio e aqueles que, a meu ver, dificultaram a sua realização, destacando-se como Pontos Fracos. De seguida, recorrendo à perspetiva externa, evidencio uma série de fatores que, apesar de não estarem sob influência direta da entidade

de acolhimento, culminam num conjunto de Oportunidades e Ameaças sentidas no decorrer desta etapa.

5.1 Pontos Fortes (*Strenghts*)

5.1.1 Localização do INFARMED, I.P.

O INFARMED, I. P., para além de estar sediado em Lisboa, capital de Portugal, encontra-se ainda numa zona altamente privilegiada e movimentada da cidade, Alvalade. Não obstante, localizado no Parque da Saúde e murado por um jardim botânico ímpar,⁶ esta entidade regulamentar encontra-se rodeada por uma série de outras instituições públicas, destacando-se o Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I. P., o Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa Júlio de Matos, o Centro de Saúde de Alvalade e a Escola Superior de Enfermagem de Lisboa, que tornam este espaço num ambiente altamente focalizado em questões de saúde pública, propiciando a visita diária por um elevado número de utentes e profissionais.⁷

5.1.2 Acolhimento Inicial e Integração na Equipa de Trabalho

No primeiro dia de estágio curricular no INFARMED, I.P. fomos desde logo calorosamente acolhidos pelo Dr. José Viana em representação da Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP). Em conjunto com os restantes estagiários, para além de nos terem sido inicialmente introduzidas as instalações físicas da Autoridade Nacional, fomos ainda recebidos com uma curta formação relativa à sua organização estrutural e funcional, com referência às normas e políticas vigentes. No final da sessão, cada estagiário foi encaminhado para o seu orientador de estágio e, subsequentemente, integrado no respetivo departamento, unidade e equipa de trabalho. No meu caso em particular, na DAM-UMM-Procedimentos Nacionais e sob orientação da Dr.^a Dina Cordeiro Lopes, foi-me desde logo atribuído um *email* institucional, um número mecanográfico, um manual de acolhimento e um computador de trabalho com acesso à rede e a todas as plataformas informáticas necessárias para a execução plena das minhas funções.

Nos restantes dias da primeira semana, de forma a assegurar a completa contextualização e integração, assisti a um conjunto de formações internas e teóricas que me permitiram recordar conceitos previamente abordados na unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento, valorizando temas como os tipos de procedimentos de registo dos MUH e as várias alterações aos termos de AIM passíveis de serem introduzidas pelos titulares. Paralelamente, foram-me introduzidas as diversas plataformas informáticas utilizadas como

ferramentas de trabalho na DAM: SMUH-ALTER (plataforma de submissão de pedidos de alteração do sistema de gestão de MUH), GIMED (base de dados de Gestão de Informação de Medicamentos), GestProc (base de dados de Gestão de Processos), GPRen (base de dados de Gestão de Processos de Renovação) e CTS (*Communication and Tracking System*).⁸ De facto, ter uma primeira semana com um plano de estágio altamente bem delineado, permitiu “*a priori*” definir o objetivo da nossa presença e, “*a posteriori*” adquirir conhecimentos ditos fundamentais para o correto exercício das tarefas que nos foram concedidas.

5.1.3 Ambiente Profissional na DAM-UMM

Os colaboradores da DAM-UMM são farmacêuticos especializados em Assuntos Regulamentares do Medicamento e atuam como gestores de processos pós-AIM. Além de excelentes profissionais, são ainda parte integrante de uma equipa alegre, descontraída, competente e dinâmica, justificando assim o grande sucesso e produtividade desta Unidade. No decorrer da concretização das minhas tarefas foi-me sempre demonstrada uma grande amizade e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e correção de não conformidades, incentivando-me continuamente à perceção do impacto das minhas decisões no fluxo de trabalho e à realização de tarefas com o máximo de autonomia, independência e espírito crítico.

5.1.4 Competências Desenvolvidas e Tarefas Desempenhadas

O meu estágio na DAM-UMM permitiu-me estudar, investigar, debater e analisar diferentes processos, alargando, por conseguinte, os meus conhecimentos na área regulamentar do medicamento. A gestão normal de um processo de alteração inicia-se pela sua validação, ou seja, pela análise do pedido submetido através da respetiva confirmação de: coerência dos dados do requerente, comprovativo do pagamento da submissão do pedido e disponibilização da documentação necessária para avaliação (requerimento, formulário do pedido, declaração de autorização de uso de email, cópia da página relevante da *guideline*, entre outros). Se administrativamente tudo estiver adequadamente submetido, inicia-se a fase seguinte, de avaliação, em que se procede à verificação do objetivo do pedido da alteração, da conformidade dos módulos do dossiê de AIM do medicamento e da adequação da tipificação da alteração em causa.

De um modo geral, uma alteração aos termos da AIM pode ser classificada como alteração “*minor*” de tipo IA ou IB ou alteração “*major*” de tipo II, por ordem crescente de complexidade, consoante o nível de risco para a saúde pública e as repercussões na qualidade, segurança e

eficácia do medicamento sejam menores ou maiores, respetivamente. De acordo com o seu âmbito, as alterações podem ainda ser incluídas em diferentes categorias: categoria A (alterações administrativas), categoria B (alterações de qualidade, que designarei por alterações farmacêuticas), categoria C (alterações de segurança, eficácia e farmacovigilância, que designarei por alterações médicas) e categoria D (alterações aos dossiers principais do plasma e aos dossiers dos antigénios das vacinas).⁹ Neste contexto, foram várias as alterações submetidas que me permitiram aplicar conhecimentos obtidos em unidades curriculares como Tecnologia Farmacêutica e Assuntos Regulamentares do Medicamento: alterações onde o requerente pretendia adicionar ou substituir fabricantes, introduzir um novo procedimento analítico ou alterar um já existente, alterar o processo de fabrico do produto acabado, adicionar uma nova embalagem para comercialização, corrigir e rever as informações existentes no Resumo das Características do Medicamento (RCM), Folheto Informativo (FI) e Rotulagem de acordo com a versão mais recente do Quality Review of Documents (QRD), entre outras.

Com o decorrer do tempo, considero que retive e fortaleci competências fundamentais para vingar no mercado de trabalho atual. As mais evidentes foram as competências informáticas que, no início, sendo as plataformas de gestão dos processos caracterizadas por modos de funcionamento pouco intuitivos, se revelaram como um verdadeiro desafio de aprendizagem. Contudo, graças à constante consulta, atualização e operacionalização de *softwares* internos (como o GIMED), de plataformas de gestão - nacionais (SMUH-ALTER, GestProc e GPRen) e/ou europeias (CTS) – e de plataformas para a submissão de documentos (CESP, EudraGMP e Eudralink), consegui reverter todas estas dificuldades e receios em valências gradualmente adquiridas. Em concordância, realço o aprofundamento do meu conhecimento relativo a legislações e políticas do medicamento graças à consulta e leitura diária de *guidelines* fornecidas pela Comissão Europeia e Agência Europeia do Medicamento (EMA). Neste contexto, refiro ainda a aptidão adquirida na extração rápida de informação a partir de documentos deveras extensos e confusos. Por fim, destaco a necessidade de enquadramento e utilização de linguagens técnicas e científicas de carácter claro e formal aquando do vasto contacto estabelecido com titulares nacionais e peritos do INFARMED, I.P..

5.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)

5.2.1 Fluxo Irregular de Trabalho com Sobrecarga dos Colaboradores

Devido à ligação estatal, o INFARMED, I.P. encontra-se continuamente dependente de decisões políticas. Por conseguinte, dadas as circunstâncias económicas que o país atravessa,

o recrutamento de novos colaboradores para o INFARMED, I. P. parece uma realidade inalcançável, resultando a falta de recursos humanos numa lacuna bem evidente durante todo o meu percurso.¹⁰

Por ano são submetidos ao INFARMED, I.P. cerca de 1000 novos pedidos de AIM e 40 000 pedidos de alterações pós-AIM.¹¹ Desta forma, o elevado número de processos de Procedimentos Nacionais em contínua submissão aliado ao elevado número de estagiários acolhidos simultaneamente na DAM, resultou numa constante irregularidade do fluxo de trabalho em que, por vezes, possuía tarefas que mal preenchiavam um dia inteiro de estágio e outras em que, pelo contrário, a sua execução e conclusão prolongava-se por uma série de dias. De facto, eram constantes os atrasos por parte dos titulares na submissão de respostas aos pedidos de elementos levando, muitas das vezes, à acumulação de processos não resolvidos e ainda em alvo de apreciação. Não obstante, apesar de reconhecer que nenhum esforço faltou aos gestores da equipa para que com a maior disponibilidade nos fossem explicadas novas matérias e esclarecidas dúvidas, foi clara a sobrecarga de trabalho sentida pela nossa orientadora ao ter de coordenar simultaneamente 7 estagiários, enquanto concluía os seus processos no tempo e calendarização previstos.

5.3 Oportunidades (*Opportunities*)

5.3.1 Assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos

No penúltimo dia de estágio foi dada a todos os estagiários da DAM a possibilidade de assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos (CAM). Periodicamente e segundo um calendário definido, estas reuniões de carácter confidencial destinam-se à análise de pareceres, elaborados por peritos meticulosamente escolhidos, de pedidos de AIM, Alterações ou Renovações, na presença de Médicos, Toxicológicos e Avaliadores Farmacêuticos. Com três dias úteis de antecedência é enviada a ordem de trabalhos da reunião a todos os que nela participarem, destacando desde logo a presença do Prof. Dr. Francisco Veiga e do Prof. Dr. João José de Sousa como peritos. Tendo como objetivo a garantia da qualidade, eficácia e segurança de todos os medicamentos em análise, durante a reunião são colocadas questões e esclarecidas dúvidas, nomeadamente quando surgem pareceres não positivos ou discordantes que dificultam a aprovação do processo de um dado medicamento.¹²

5.3.2 Entidade Máxima da Regulamentação do Medicamento em Portugal

Apesar da existência de procedimentos base e de passos-chave, nenhum processo em resolução se equipara a um já resolvido ou a outro que ainda chegará por resolver. Há sempre uma particularidade ou uma exceção capaz de distinguir um processo de outro e que, facilmente, alterará por completo o curso das fases de validação e avaliação. Desta forma, sendo o INFARMED, I.P. a entidade máxima de regulamentação do medicamento em Portugal, considero que a oportunidade de reconhecer, interpretar e discutir critérios subjacentes às mais variadas avaliações medicamentosas com uma equipa dotada da maior experiência e profissionalismo foi, sem dúvida, uma mais-valia ímpar na minha formação. Na reta final, antes de ingressar no mercado de trabalho, posso assim, considerar-me em vantagem perante outros futuros farmacêuticos em razão do contacto prévio com a face regulamentar que, atualmente, em tanto influencia o mercado farmacêutico nacional, internacional e, consequentemente, a saúde pública.

5.4 Ameaças (*Threats*)

5.4.1 Falha dos Recursos Tecnológicos

Foram inúmeras as vezes que o desadequado funcionamento dos meios eletrónicos de trabalho, sobretudo os computadores, atrasaram o seguimento dos processos. Muitos foram os momentos em que estes ao bloquearem sem explicação e carecendo de uma rápida reiniciação comprometeram todo o trabalho realizado, quer dos colaboradores quer dos estagiários. Em acréscimo aos problemas de *hardware*, também os *softwares* internos apresentavam constantes irregularidades técnicas, salientando-se a impossibilidade de carregar ficheiros no SMUH-ALTER com tamanho superior a 10 Mb ou o lento processamento do GIMED. Acredito que todas estas ferramentas deveriam ser devidamente atualizadas e revistas para versões modernas, rápidas e mais eficazes de forma a facilitar o trabalho de todos os colaboradores e, consequentemente, garantir o máximo de celeridade e correção no tratamento dos processos submetidos.

5.4.2 Deslocalização do INFARMED, I.P. para o Porto

Durante os meus três meses de estágio no INFARMED, I.P. a problemática da potencial deslocalização para o Porto foi sempre uma constante. Com a previsão de que, nos próximos anos, se verifique um acréscimo no mercado do número de novas moléculas com potencial terapêutico, foi nítido o clima de tensão e instabilidade vivido por toda a equipa. A provável

perda de recursos humanos levaria, consecutivamente, à interrupção da atividade diária e operacionalidade do INFARMED, I.P., culminando em consideráveis consequências financeiras e na incapacidade desta grande autoridade continuar a salvaguardar o acesso dos medicamentos, dispositivos médicos e cosméticos a toda a população portuguesa.

6. Conclusão

O Estágio Curricular na Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – INFARMED, I.P. tornou-se numa das experiências mais entusiasmantes e prestigiantes do meu percurso académico. De facto, contactar diariamente com a área dos Assuntos Regulamentares, e em especial com a Unidade de Manutenção no Mercado da Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM-UMM), revelou-se como uma enorme oportunidade de aprendizagem, na qual fui preparada com o máximo de excelência e disponibilidade para a futura entrada no mercado de trabalho. Por conseguinte, deixo desde já uma nota de apreço para toda a equipa da DAM-UMM e, em especial, para a minha orientadora com a qual contactei e colaborei diariamente.

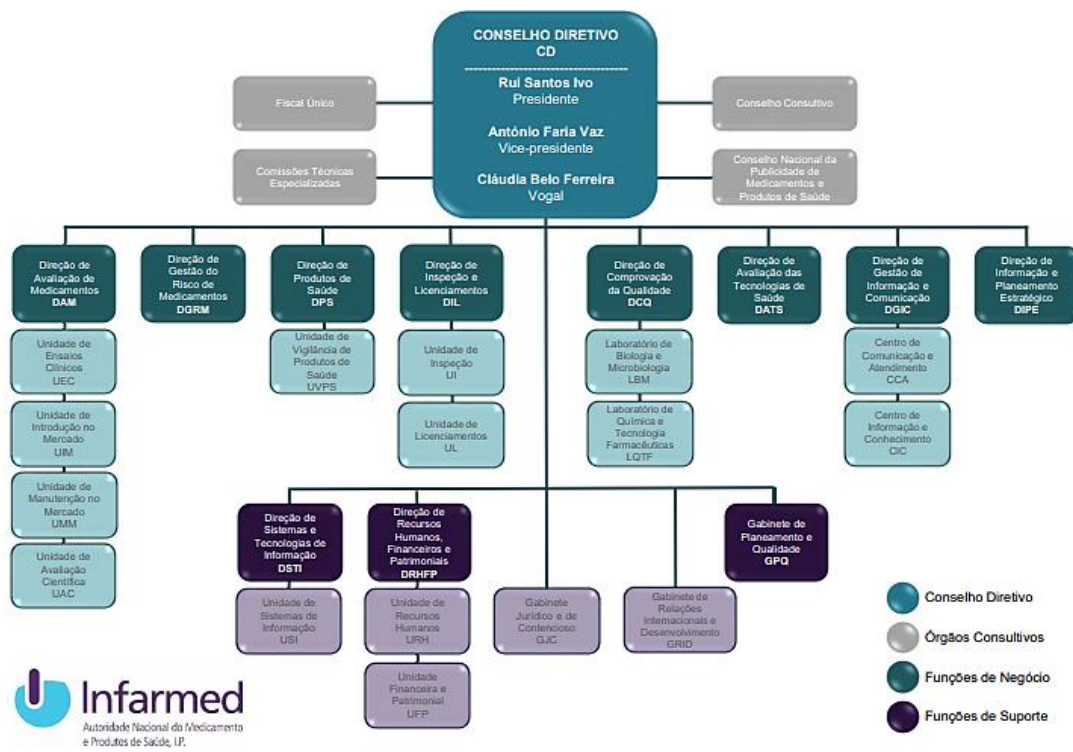
Atualmente, a FFUC é a única Faculdade de Farmácia do país que integra no seu plano de estudos uma unidade curricular obrigatória de Assuntos Regulamentares do Medicamento. Desta forma, todos os conhecimentos previamente adquiridos, mostraram-se não só essenciais na rápida integração e execução das tarefas propostas pelas equipas do INFARMED, I.P., como também me destacam positivamente perante outros futuros farmacêuticos, conferindo-me uma diferenciação profissional nesta área vital do ramo farmacêutico.

Três meses depois, fui assoberbada por dois sentimentos contraditórios: um de grande tristeza, já que tive de abandonar uma equipa de trabalho que rapidamente se tornou num amplo grupo de amigos e, um de grande felicidade, pela tamanha oportunidade proporcionada pela FFUC que sempre me incitou e ensinou a colaborar com o maior rigor, brio, humildade, conhecimento e responsabilidade.

7. Bibliografia

1. Decreto-Lei n.º 288/2001 de 10 de novembro de 2001 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, nº 261 de 10 de novembro de 2001.
2. INFARMED, I.P. **Apresentação** [Consultado a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>
3. INFARMED, I.P. **Estrutura e Organização** [Consultado a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao>
4. INFARMED, I.P. **Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM)** [Consultado a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dam>
5. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA. **Normas Orientadoras do Estágio Curricular**. (2019).
6. INFARMED, I.P. **Onde Estamos** [Consultado a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/contactos/onde-estamos>
7. JUNTA DE FREGUESIA DE ALVALADE. **Parque da Saúde** [Consultado a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.jf-alvalade.pt/alvalade/mapa-de-alvalade/>
8. INFARMED, I.P. **Serviços Online – Medicamentos de Uso Humano** [Consultado a 7 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line>
9. EUROPEIA, C. - **Regulamento (CE) N.º 1234/2008 da Comissão, de 24 de novembro de 2008, relativo à análise das alterações dos termos das autorizações de introdução no mercado de medicamentos para uso humano e medicamentos veterinários, alterado pelo Regulamento (UE) n.º 712/2012 da Comissão de 3 de agosto de 2012**. 334 (2008) I - 32.
10. Decreto-Lei n.º 46/2012 de 24 de Fevereiro de 2012 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, nº 40 de 24 de Fevereiro de 2012.
11. INFARMED, I.P. **Estatística do Medicamento** [Consultado a 7 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/publicacoes/tematicos/estatistica-do-medicamento
12. INFARMED, I.P. **Comissão de Avaliação de Medicamentos** [Consultado a 7 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/comissoes-tecnicas-especializadas/comissao-de-avaliacao-de-medicamentos>

8. Anexo I – Organograma do INFARMED, I.P.



PARTE III

**MONOGRAFIA INTITULADA
“DESIGNER NUCLEASES: GENE-
EDITING THERAPIES USING CCR5
AS AN EMERGING TARGET IN HIV”**



Orientadora: Professora Doutora Ana Miguel Matos

Table of Contents

Abstract	40
Resumo	40
1. List of Abbreviations.....	41
2. Introduction.....	43
3. HIV Replication Cycle: Overview on the Attachment Process	44
4. CCR5 as a Standard Chemokine Receptor	45
5. “Natural” Gene Therapy: The Berlin Patient.....	47
5.1 The CCR5 Δ 32 Mutation.....	47
5.2 Case Report: Defeating HIV	48
5.3 Can the “cure” be replicated? The Major Challenges.	49
6. Anti-HIV Gene Therapy: Designer Nucleases Technology	51
6.1 Possible Genome Targeting Approaches.....	53
6.2 ZFN and TALEN-mediated CCR5 Gene Disruption.....	54
6.2.1 Structural Design and Mechanism of Action	54
6.2.2 Refining ZFNs and TALENS: Specificity and Toxicity.....	57
6.3 CRISPR/Cas9 mediated CCR5 Gene Disruption.....	61
6.3.1 CRISPR/CAS Discovery as a Remarkable Gene Editing Tool.....	61
6.3.2 How does CRISPR/Cas9 Work? Brief Description.	63
6.3.3 Increasing CRIPSR/Cas9 Specificity.....	65
7. Conclusion	69
8. References.....	71
9. Annex I.....	87
10. Annex II.....	88

Abstract

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), caused by Human Immunodeficiency virus (HIV), is a life-threatening disorder that persists worldwide as a severe health problem. Since it was connected with HIV attachment process, the Chemokine receptor CCR5 has been at the development leading edge of several gene-based therapies. Given the shortcomings of the current anti-retroviral treatment procedure and the non-availability of a licensed vaccine, the aptitude to modify complex genomes with Designer Nucleases has had a noteworthy impact on biotechnology. Over the last years, ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 gene-editing technology has appeared as a promising solution that mimics the natural occurring CCR5/ Δ 32 mutation and then permanently guarantees the absence of CCR5-expression on HIV target-cells surface, leading to a continuous resistance to the virus entry and, ultimately, proving that cellular immunization from infection could be, in fact, a conceivable therapeutic approach to finally achieve the long-awaited HIV functional cure.

Keywords: AIDS, HIV, Chemokine receptor, CCR5, Designer Nucleases, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, Gene-Editing, CCR5/ Δ 32 mutation, Functional Cure.

Resumo

O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), decorrente da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), é uma condição clínica potencialmente fatal que persiste mundialmente como um drástico problema de saúde. Desde que foi associado ao processo de adsorção pelo VIH, o Recetor de Quimiocinas CCR5 tem estado na vanguarda do desenvolvimento de múltiplas técnicas de terapia génica. Considerando as limitações existentes no atual protocolo de tratamento anti-retroviral e a inexistência de uma vacina aprovada, a capacidade das Nucleases de Design modificarem genomas complexos desencadeou um notável impacto na área da biotecnologia. Nos últimos anos, a tecnologia de edição génica pela ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 surgiu como uma solução promissora capaz de mimetizar a ocorrência natural da mutação CCR5/ Δ 32 e, em consequência, garantir consistentemente que o CCR5 não se expressa à superfície das células-alvo do VIH, permitindo uma contínua resistência à entrada do vírus e, em última análise, comprovando que a imunidade celular à infecção pode emergir como uma plausível abordagem terapêutica, determinante no alcance da tão desejável cura funcional à infecção pelo VIH.

Palavras-Chave: SIDA, VIH, Recetor de Quimiocinas, CCR5, Nucleases de Design, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, Edição de Genes, Mutação CCR5/ Δ 32, Cura Funcional.

I. List of Abbreviations

AAVVs - Adeno-Associated Viral Vectors

AdVVs - Adeno-Viral Vectors

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

amfAR - Foundation for AIDS Research

AML - Acute Myeloid Leukemia

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

cART - Combination Anti-Retroviral Therapy

Cas9 – CRISPR-associated protein 9

CRISPR/Cas9 - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats with associated protein 9

crRNA - CRISPR RNA

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DSB - Double Strand Break

dsDNA - Double Stranded DNA

GPCRs - G protein-coupled receptors

GVHD - Graft versus Host Disease

HDR - Homology-Directed Repair

HGNC - Gene Nomenclature Committee of The Human Genome Organization

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HLA - Human Leukocyte Antigen

HSC - Hematopoietic Stem Cell

LVVs - Lentiviral Vectors

MHC - Major Histocompatibility Complex

ncRVDs - Nonconventional RVDs

NmCas9 - *Neisseria meningitidis* Cas9

NHEJ - Non-Homologous End Joining

ORF - Open Reading Frame

PAM - Protospacer Adjacent Motif

RVDs - Repeat-Variable Di-Residues

RNA - Ribonucleic Acid

SaCas9 - *Staphylococcus aureus* Cas9

StI Cas9 - *Streptococcus thermophilus* Cas9

SpCas9 - *Streptococcus pyogenes* Cas9

TALEN - Transcription Activator-Like Effector Nuclease

tracrRNA - Trans-Activating CRISPR RNA

WHO - World Health Organization

WNV - West Nile virus

ZFN - Zinc Finger Nuclease

(+) ssRNA - Positive-Sense Single-Stranded RNA

3'UTR - 3-untranslated region

5'UTR – 5- untranslated region

2. Introduction

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is a pandemic disease and a potentially life-threatening disorder caused by human immunodeficiency virus (HIV).¹ From the late 80s, two main types of HIV have been identified as responsible for substantial morbidity and mortality worldwide: HIV-1 and HIV-2.² Currently, HIV-1 is thought to be the causative agent for the majority of HIV infections, and therefore it can be recognized as the primary target for prevention and treatment of AIDS.^{2,3}

The development of combination anti-retroviral therapy (cART) has improved the long-term clinical management and the treatment options for HIV-infected patients.⁴ In fact, the development of specific cART therapeutic regimens became one of the greatest medical achievements of the twentieth century, due to its ability to continuously suppress viral replication to low or even undetectable HIV levels.^{2,5} Notwithstanding this achievement, cART is still incapable to eradicate the virus in virtue of HIV ability to stably integrate its double stranded of DNA – dsDNA - into variable sites of the infected cells genome and therefore remain quiescent and undetectable as a latent reservoir in multiple resting cells.⁶ Nonetheless, if cART therapy regimen is interrupted, latent HIV reservoirs can replenish viral replication when resting cells are re-activated after specific antigen-recognition, indicating that patients require lifelong treatment and making AIDS a manageable yet incurable disease.^{6,7}

The sustained antiviral efficacy of cART requires strict and daily adherence to the treatment protocol.⁵ However, all the treatment perspectives can be compromised by several drug-induced toxicities and an increasing trend of HIV drug-resistances that can arise before or during antiretroviral therapy.⁴ In addition, life expectancy of HIV-infected people remains reduced, compared with general population, by long-term complications such as non-AIDS HIV-associated conditions (liver and cardiovascular diseases, osteoporosis, diabetes mellitus and certain cancers), which along with cART-constraints result in a colossal pressure on global health care budgets.^{5,8}

Since it was connected to HIV-cellular entry in 1996, the chemokine receptor CCR5 has been the key target for numerous co-related scientific researches. Therefore, intensive studies lead to the development of small molecular drugs targeting CCR5 with Maraviroc[®] becoming, in 2007, the first clinically approved chemokine receptor inhibitor.⁹ Latterly, the apparent HIV cure in a patient transplanted with CCR5-depleted hematopoietic stem cells - “The Berlin Patient” - has led to a resurgence of interest in inactivating CCR5 through gene therapy, either as a stand-alone approach or as an adjuvant to pharmacological drug regimens.¹⁰ Thereafter, given the shortcomings of the current treatment procedure and the non-

availability of a licensed vaccine against HIV, this review will focus on the prospects of novel and successful genetic engineering therapeutic approaches – the Designer Nucleases - to effectively disrupt CCR5. As a result, the Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats with associated protein 9 (CRISPR/Cas9) technology has appeared as a promising solution that permanently guarantees the absence of CCR5-expression on host-cells surface, leading to a continuous resistance to the HIV attachment process and, ultimately, proving that cellular immunization from infection could be a therapeutic possibility to acquire a realistic functional cure.^{2,5,7,9}

3. HIV Replication Cycle: Overview on the Attachment Process

HIV can be labelled as an intracellular microorganism, which is unable to grow or reproduce apart from a living cell.¹¹ As a result, this virus is capable of infecting several cell types, such as macrophages, immature dendritic cells and, particularly, CD4 helper T cells, that are crucial for the maintenance of a functional immune system. Overall, the process where HIV uses the host cellular machinery to multiply and spread throughout the body is carried out in several steps, including attachment, penetration, replication, assembly, release and final maturation of new virus.^{12,13}

Firstly, the attachment process (Figure 1) initiates with close interaction between the virus gp120 surface protein and the host cell CD4 receptor, which triggers a conformational change in the virus gp120 structure. Consequently, the glycoprotein gp120 bind to one of the chemokine co-receptors available on the host cell surface, being preferentially either CCR5 or CXCR4: virus strains that bind to CCR5 and CXCR4 are called R5-tropic and X4-tropic, respectively, while strains that bind to both CCR5 and CXCR4 are designated R5X4. Of the two probable co-receptors, CCR5 is the predominant receptor for HIV cell entry. Consequently, it is important to emphasize that R5-tropic strains are the most frequently transmitted and are predominant during early stages of infection, even though X4-tropic strains emerge later with disease progression.^{14,15}

Secondly, gp120 intimal contact with both the receptor and co-receptor leads to another virus conformational change where the insertion of the fusion peptide (located at the amino terminus of the transmembrane protein gp41), into the cell membrane, takes place. Afterwards, the resulting fusion of the virus envelope with the cell cytoplasmic membrane enables the delivery of the viral nucleocapsid into the cellular cytoplasm.¹⁶

Finally, inside the host cell, HIV positive-sense single-stranded of RNA - (+)ssRNA - is converted by reverse transcriptase into double stranded DNA – dsDNA - and then integrated into the nucleus host chromosome as a provirus. Once integrated into the cellular DNA, HIV begins to use the biosynthetic machinery of the host cell to further replication, release and maturation of novel infectious virus.¹⁷

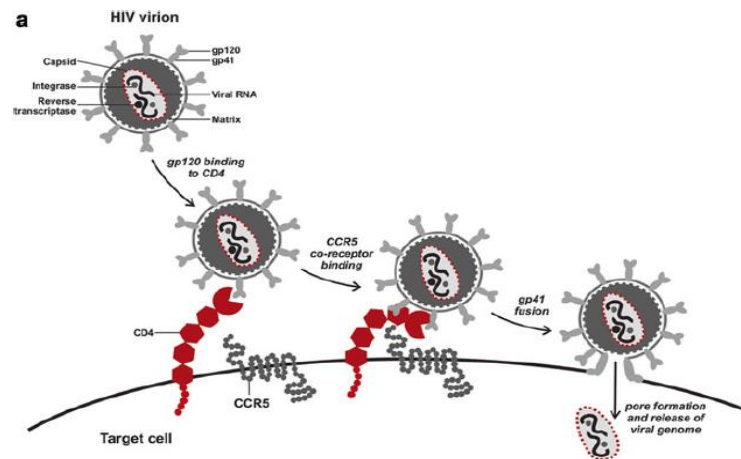


Fig. I: Attachment and penetration of HIV R5-tropic HIV.¹

4. CCR5 as a Standard Chemokine Receptor

G protein-coupled receptors (GPCRs) symbolize the largest family of transmembrane cellular receptors and comprise nearly 3% of the genes encoded in the human genome.^{18,19} The conformational changes of GPCRs upon ligand binding trigger the associated G protein to initiate a sequence of intracellular reactions that control a broad selection of physiological functions.²⁰ Up to now, among the 800 members of the GPCR family already identified, approximately 450 exhibit sensory functions, mediating olfaction, taste and light perception. The remaining 350 non-sensory GPCRs can attach to a variety of ligands, including hormones, neurotransmitters, calcium ions or chemokines. Notwithstanding, all GPCRs share a rudimentary structure based on a single polypeptide with an extracellular N-terminus, an intracellular C-terminus and seven hydrophobic transmembrane domains linked by three extracellular loops and three intracellular loops.²¹ Despite these similarities, each GPCR have characteristic signaling pathways and complex regulatory processes.²²

Based on sequence homology and functional similarities, GPCRs have been classified/divided into six classes (A-F scheme)²⁰: Class A (rhodopsin-like), Class B (secretin receptor family), Class C (metabotropic glutamate), Class D (fungal mating pheromone receptors), Class E (cyclic AMP receptors) and Class F (frizzled/smoothened).²¹ Accounting

for around 80% of GPCRs, the rhodopsin family is undoubtedly the principal sub-family and include the Chemokine Receptors, CCR5 and CXCR4.^{18,20}

Chemokine Receptors are stimulated by straight interaction with chemotactic cytokines, also known as chemokines.²³ On its turn, chemokines consist on small-secreted proteins, with 8-14 kDa, and are directly related with development and homeostasis of the immune system.^{24,25} In addition to their aptitude as inducers of leukocytes chemotactic migration, these peptides can similarly be expressed on, and regulate the biology of, several non-leukocytic cell types.²⁶ For this reason, an interference with chemokines regulatory and secretion process, not only compromise the proper leukocyte migration in protective immune responses but also have impact on immune and inflammatory diseases including allergy, atherosclerosis and cancer.²

Chemokines are classified depending on their primary amino acid sequence and the arrangement of specific structurally cysteine residues within the mature protein. Therefore, discrepancy between the exact configuration of the two cysteines closest to the N-terminus permits chemokines to be divided into four subfamilies (Figure 2): CC, CXC, CX3C and XC, of which the CC and CXC encompass the leading members. In CC chemokines (also known as β -chemokines), these cysteines are straightly juxtaposed, while CXC chemokines (also known as α -chemokines) have a sole variable amino acid between them. The individual CX3C chemokine has three amino acids flanked by these two cysteines, while XC chemokines suffer the absence of the motif's first and third cysteines.²⁷ Regularly, this system is used to classify chemokines (L) and chemokine receptors (R).²⁵

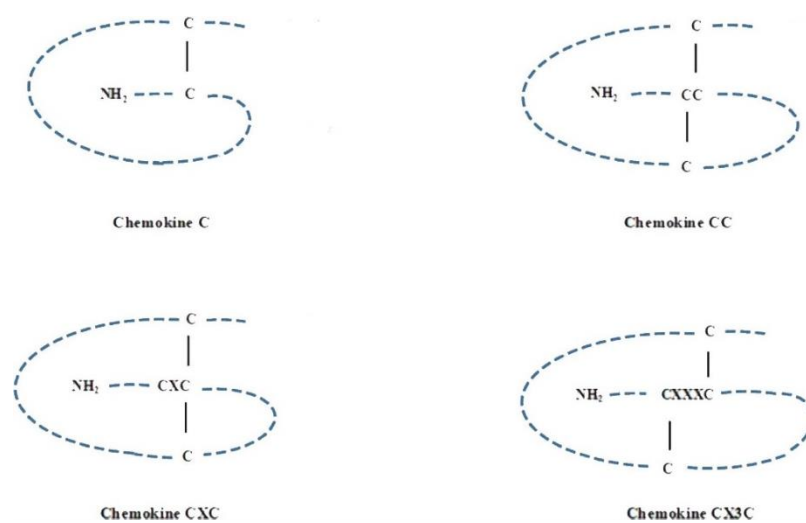


Fig. 2: Structure of the four subtypes of chemokine ligand.²⁸

The chemokine receptor CCR5 can bind to numerous proinflammatory C–C motif chemokines that are archetypally released as part of innate or adaptive immune responses.²⁹ Moreover, throughout time, several CCR5-ligands have been identified, including CCL2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, and 16. In fact, the majority have shown potential as powerful agonists but, CCL7, have revealed its character as a renowned natural antagonist.³⁰ However, many of these chemokines can also interact with extra chemokine receptors, e.g., CCL5 can not only bind to CCR5 but also to CCR1 and CCR3, while CCR5 additionally binds CCL3 and CCL4. This demonstrates the non-exclusive, indiscriminate coupling of chemokine ligands and receptors.^{31,32}

CCR5 protein has 352 amino acids, an estimated molecular weight of 40.6 kDa and it is placed on chromosome 3p21, closely to CCR2 gene which, on its turn, shares at least 70% of the CCR5 structural identity.³³ Its expression on the surface of an extensive variety of leukocytes (including memory/effector T cells, natural killer cells, B cells, monocytes) and antigen-presenting cells (such as dendritic cells and macrophages), allows straight interaction with CCR5-agonist chemokines and induces several intracellular signaling pathways. The latter encompass leukocyte migration along the chemokine gradient to the site of inflammation and enhance local inflammatory immune responses by stimulating the proliferation and effector molecule secretion of leukocytes. On the other hand, CCR5 is also expressed on a diverse range of other cells (including osteoclasts, fibroblasts, vascular endothelium, epithelium and vascular smooth muscle cells, liver cells and neurons) where it may have other equally important physiological functions that are not directly related to immune responses.^{24,34}

5. “Natural” Gene Therapy: The Berlin Patient

5.1 The CCR5 Δ 32 Mutation

Even though gene organization of CCR5 is particularly complex, it has a rudimentary structure composed by three exons, two introns and two promoters (Figure 3).^{14,35} The upstream promoter, named Pu or PR2, precedes exon 1 and is functionally weak compared to the stronger downstream promoter, Pd or PR1, which on its turn, includes the following intron 1 and exon 2 regions.³⁶ Subsequently, a different intron, termed intron 2, is placed between exon 2 and exon 3. Whilst exon 2 have been characterized as an intronless sequence that can be subdivided in exon 2a and exon 2b, exon 3 encompasses the entire intronless Open Reading Frame (ORF) of the CCR5 gene, the complete 3-untranslated region (3'UTR) and 11 base pair (bp) of the 5-untranslated region (5' UTR).^{14,35,37}

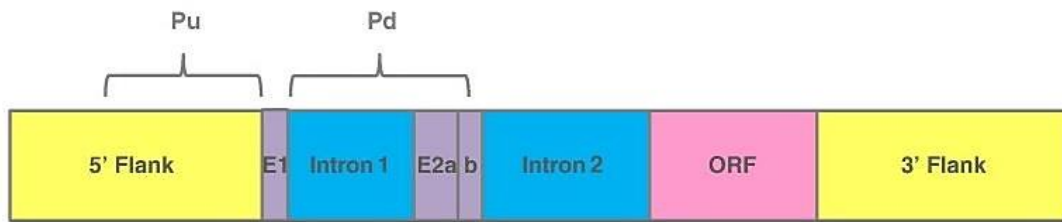


Fig. 3: Structure of the CCR5 gene.¹⁴

Expression of CCR5 on the cell surface is continuously displaying high variability among individuals.³⁸ Actually this is explained not only by the fact that CCR5 transcription can be initiated at numerous sites in either exons 1 or 2, but also due to an unclear alternative promoter usage, which results in the generation of different transcripts and, consequently, variable CCR5 expression levels.³⁵

Up to now, several mutations in CCR5 have proved to be imperative genetic factors capable of influencing not only the susceptibility to HIV-1 infection but also the rate of disease progression.³⁸ In a study conducted by Liu Rong in 1996, a genetic analysis of the CCR5-ORF exposed a natural occurring deletion of 32 base pairs comprising nucleotides 794 to 825, termed CCR5- Δ 32. In parallel, the mutation leads to the insertion of seven novel amino acids succeeding amino acid 174 and a premature stop codon at amino acid 182. As a result, a shortened form of the protein enclosing 215 amino acids contrasts with the full-length 352 amino acid wildtype CCR5.^{39,40,41} Likewise, Michel Samson and his colleagues demonstrated that CCR5- Δ 32 mutation leads to a truncated protein form, due to a precise interference with the CCR5-second extracellular loop, and so resulting in the absence of the last three protein transmembrane domains along with regions important in G-protein interaction and signal transduction.^{42,43} Most importantly, both groups emphasize that individuals homozygous for the CCR5- Δ 32 allele have a permanent CCR5-absent cell surface expression, rendering cells resistant to HIV attachment and to subsequent infection by CCR5-tropic HIV strains.^{44,45}

5.2 Case Report: Defeating HIV

The remarkable case of the “Berlin Patient”, the first individual who was declared HIV-“cured”, further highlighted the prospects of targeting CCR5 as a possible treatment for HIV infection.⁵ Timothy Ray Brown, an HIV infected man living in Berlin diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) in 2006, received a hematopoietic stem cell (HSC) transplantation from an unrelated donor, identified as major histocompatibility complex (MHC) compatible and also as homozygous carrier of the CCR5 Δ 32 mutation in the CCR5 gene.⁴⁶ The CCR5-

depleted hematopoietic stem cells engrafted, proliferated and differentiated into mature myeloid and lymphoid cells, leading to a natural resistance against HIV infection.⁴⁷ In 2008, an additional allogeneic transplant from the same donor was administered owing to AML relapse.⁴⁸ Extraordinarily, after his second transplant, it was not only possible to obtain AML remission but also to properly guarantee undetectable viral loads in the absence of HIV-cART regimens.⁴⁹ Thus far, the patient persists cancer-free and HIV-negative, indicating that homozygous CCR5 Δ 32-HSC transplantation could be a possible alternative as a clinical solution to both the blood-related malignancy and the HIV-1 infection.^{1,50}

During this clinical procedure, the “Berlin Patient” initiated a high-dose chemotherapy regimen to treat his AML and received total body irradiation, both not merely to strengthen the chemotherapeutic treatment but also to eliminate his own HSCs, thus enabling engraftment of the allogeneic HSCs.^{51,52} Simultaneously, Timothy was treated with cytotoxic agents that were used in Graft versus Host Disease (GVHD) prevention, such as polyclonal antibodies (e.g. Antithymocyte Globulin) and calcineurin inhibitors (e.g. Cyclosporine).⁵³ However, despite clinical efforts, an auspiciously GVHD established after the treatment, where donor-derived immune cells possibly eradicated residual leukemia cells along with HIV-infected donor immune cells, including viral reservoirs.⁴ As a result, even though an allogeneic transplant from a regular donor cannot clarify in itself this prosperous report of a cured-HIV patient, it is conceivable that transplantation with HIV-resistant cells, myeloablative therapy, anti-T-cell therapy and alloimmune responses might all have contributed to the witnessed long-term control of HIV.⁹

5.3 Can the “cure” be replicated? The Major Challenges.

Globally, there are approximately 16,000,000 people signed up as stem cell donors. Concerning a 10/10 allele Human Leukocyte Antigen (HLA)-match *per se*, the possibility of finding a suitable donor is over 80% and fortunately, there is regularly more than 1 donor and sporadically more than 100 donors available for each patient.⁵⁴ According to sighted data, the naturally occurring CCR5- Δ 32 mutation diverges worldwide among people from different ethnic groups. Numerous studies revealed that in African and Asian individuals the mutant allele is nearly non-existent and, also, that the homozygous mutation in Caucasians only reaches values from 1 to 2%.⁵⁵ Consequently, along with these clinical limitations, the short period commonly available to the donors-CCR5 genotype screening process make this methodology practically unmanageable, enlightening the adversity of finding an HLA-identical unrelated donor with CCR5-absent surface expression.⁵⁵

Since the noteworthy clinical result of the “Berlin Patient”, there has been an eminent level of interest in translating this approach to a broader group of patients.⁴⁷ Seven years after his fruitful HIV and AML recovery, a second patient received an identical treatment. However, after transplantation, the viral load of the latter man rebounded with an HIV quasi-species able of using an alternative chemokine receptor, namely CXCR4.⁵⁶ Even after engraftment of genetically modified cells, long-lived cells latently infected with replication-competent HIV exhibited a persistent production of new virions.²⁹ As a result, when viral suppression is not properly accomplished and the HIV-reservoir size has not been totally repressed, residual non-modified CD4+ cells may stand as essential cores of viral growth that, eventually, can lead to a CCR5-independent emergence of CXCR4-using HIV variants, and subsequent therapeutic failure.^{14,29,57} This incident raised numerous questions concerning the viability of several novel CCR5 down-regulation techniques, where its therapeutic potential must be restricted to HIV-infected patients not sheltering CXCR4-using viral strains.⁴⁶

It is equally important to be aware of the side effects resulting from high-dose chemotherapy, total body irradiation and allogeneic stem cell transplantation. They both seem strictly influenced by the HLA matching-degree between donor and recipient, by the clinical condition and age of the patient, by the specific treatment regimen applied and by the suppression level of the immune system.⁵⁸ Particularly, allogeneic stem cell transplantations themselves are hazardous, holding a 40% to 55% mortality rate and being only ethically acceptable in cancer patients deprived of treatment alternatives.²⁹ Nonetheless, instead of allogeneic stem cell transplantations, a new and promising treatment option is to genetically transform autologous cells, where the disruption of the CCR5 gene can make CD4+ T cells likely resistant towards CCR5-tropic HIV variants.⁶

Lastly, apart from its renowned protective effect in HIV infection, the clinical impact of the CCR5 Δ 32-mutation on other diseases remains controversial.¹⁴ In this regard, the Δ 32 allele has been positively associated with atherosclerosis, due to its ability to reduce pro-atherogenic cytokines and the accumulation of monocytes/macrophages in atherosclerotic plaques.⁵⁹ Contrarily, it plays a negative role in post-infection inflammatory processes, which cannot only injure tissue but can likewise generate further pathology.⁶⁰ In fact, homozygous patients for CCR5 Δ 32 were found to be at higher risk for a neuroinvasive form of tick-borne encephalitis after infection with West Nile virus (WNV), being associated with development of early symptoms and additional protuberant clinical manifestations.^{61,62} Therefore, the technology improvement related to the modulation of stem cells seems indispensable, in order to

minimize possible risks and disease-related complications that can arise or be heightened during the treatment.

6. Anti-HIV Gene Therapy: Designer Nucleases Technology

According to Parliamentary Office of Science and Technology, Genome Editing involves manipulating the genetic code at targeted locations within the DNA sequence and has an extensive range of applications in biomedical research, human therapies (somatic-cell therapies that only affect the patient himself or germline therapies that may be inherited by future generations) and even agriculture, which all have prospective benefits for human health.^{63,64} The targeted modification of the human genome uses enzymes, particularly nucleases, not only to change individual genetic code bases with the purpose of disabling, repairing or modifying the function of a gene, but also to precisely introduce a new gene, thereby conceding a different function or characteristic to a living cell.^{63,65}

As reported by the Foundation for AIDS Research (amfAR), an HIV infected person needs to fulfil three main principles to be considered effectively cured: be capable of living a normal and healthy life; persist in the absence of antiretroviral therapy or any other HIV-related medications; and be incapable of transferring the virus to others.⁶⁶ In fact, the outbreak of the HIV pandemic, the urgent requirement for an HIV cure and the risks associated with myeloablative conditioning-based transplantation procedures became the modicum for scientists to start considering HIV-gene therapy as a potential groundbreaking strategy.⁶⁷ Therefore, in HIV research, there are two possible clinical options: achieving a functional cure or an eradicating (“sterilizing”) cure. The eradicating cure, which is highly desirable but difficult to accomplish, and practically unmanageable to prove, attempts to entirely remove all replication-competent viruses from the body, including those in blood circulatory system and latent reservoirs. On the other hand, a functional cure, where the virus may not have been totally eliminated but would be efficiently controlled and prevented from affecting disease progression may be the most faithful hope in the near future.^{68,69}

As scientific noted, HIV/AIDS has long been at the leading edge of gene-based therapies development, where a vast number of gene therapy approaches to inhibit CCR5 expression are being performed, in order to mimic the CCR5 null phenotype of a CCR5-Δ32 homozygote person.⁷⁰ Although CCR5 knock-out is an encouraging anti-HIV approach, it equally raised some critical concerns, such as the fact that CCR5-disruption may avoid the migration of T cells and monocytes/macrophages in response to its natural chemokine ligands. Consequently,

it is required to carefully measure the implementation of any CCR5 gene editing therapy, concerning not only the patient himself but also his singular and variable clinical constraints.^{71,72}

Over the last years, different types of genome editing techniques have been defined depending on the engineered process used by nucleases enzymes to target specific genomic sites. Nonetheless, considering their specific mechanism of action, all the gene editing approaches have evidenced common specificities: firstly, customized guides recognise one or more specific site(s) within the genome and target the nuclease to the site(s). Secondly, nucleases are enzymes that act like molecular “scissors” to cut the DNA at the selected site(s). Finally, the cell’s in-built repair mechanisms are organised to repair the cut, where novel DNA sequences may be integrated into the cell genome.^{63,73} Similarly, several key advantages of using targeted nucleases were identified: it is only required a transient treatment protocol; the cell-genetic modification is inheritable; gene expression can be controlled by an endogenous promoter to accomplish properly regulated levels of expression; and, concluding, for transgenes the integration is site-specific, not arbitrary, granting a theoretically more steady level of expression and a better safety profile than other renowned methods.^{4,74} Nevertheless, it is important to emphasize that the clinical implementation of an anti-CCR5 genome technology oblige substantial development efforts to recognize protocols that could distribute engineered nucleases to target cells, while preventing off-target effects at nontargeted sites.⁷⁵ With the purpose of circumventing possible social or ethical concerns that may disturb its future use, the development of appropriate *in vitro* and *in vivo* model systems to allow the necessary and rigorous preclinical safety studies is also required.⁷⁶

In 1996, the first customizable nuclease for gene editing - the Zinc Finger Nuclease (ZFN),⁷⁷ were first stated by Chandrasegaran and colleagues. It took an additional decade of process-optimization until Dana Carroll,⁷⁸ at the University of Utah, started to develop this technology in multiple *in vivo* models where custom-designed ZFNs were prepared and firstly injected into *Drosophila* embryos.⁷⁹ Despite various independent scientific groups had fruitfully used ZFNs to modify target genes in other animals,⁸⁰ plants,⁸¹ and human cells,⁸² this genetic approach hastily appeared cytotoxic due to uncertain cleavage at various off-target sites with high sequence homology to on-target sites in cells.⁷⁹ To overcome this drawback, clinical researchers discovered and presented numerous specificity and activity ZFNs improving-methods.⁸³ However, the clinical answer for the cytotoxicity issue arose from an unpredicted source: *Xanthomonas*, a bacterial plant pathogen. In 2009, two scientists groups, one led by Ulla Bonas and Jens Boch at Martin Luther University and the other by Adam Bogdanove at Iowa State University, independently splintered the code of *Xanthomonas*-derived

transcription-activator-like effector nucleases (TALENs), becoming the second gene editing system to be reported.⁸⁴ Outstandingly, TALENs exhibited slight cytotoxicity in human cells, raising hopes that genome engineering would become easier and seamless.⁷⁰ However, in 2012, it was the emergence of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats with associated protein (CRISPR/Cas) technology that revolutionized targeted genome editing at an imposing and maintainable way.⁷⁸ Therefore, among these three genetic approaches, CRISPR-Cas and, more precisely, CRISPR/Cas9 (Cas9 = Crispr-Associated Protein 9 Nuclease) technology is the latest and most promising “player in the field”, as it will be subsequently discussed.⁸⁵

6.1 Possible Genome Targeting Approaches

For a CCR5 disruption-based HIV therapy, two probable cellular targets have been intended: CD4+ T cells, which are the principal HIV-infected cells, or CD34+ HSCs, which act as progenitor cells and so give rise to novel HIV-resistant cells.⁷⁵ The advantages of these two approaches are evident: since the genetic modification is developed in autologous cells (cells that are body removed, stored, and later reinfused to the same person),⁸⁶ there is no necessity for HLA matching, which decreases the hazard of developing graft-versus-host-disease. Furthermore, there is no requirement for transplantation immunosuppressive therapy, once patients, after being provided with an autologous pool of HIV-resistant cells, will have the immune system either transiently or permanently restored, depending on clinical selection between the CD4+ T cells or the CD34+ HSCs, respectively (Figure 4).¹

In the first clinical situation, patient derived CD4+ T cells will be collected by apheresis (an extracorporeal therapy in which blood is removed from patient circulation, separated into its components, accordingly processed and finally returned) and then modified *ex vivo*, using designer nucleases.⁸⁷ Modified cells will be amplified *in vitro* and later reintroduced in the patient. For the therapy to be effective, in the *in vitro* amplification phase, it is mandatory to have a great number of CD4+ T cells in order to retain skilled proliferative and effector functions. As a result, once the procedure is completed, a conscious suspension of patient antiretroviral therapy would, subsequently, let the virus infect and replicate only in susceptible cells (non-modified cells expressing CCR5). Gradually, the latter cells perish in virtue of the immune system recognition process and the cytopathic virus cellular effect. Thereafter, only CCR5-depleted cells will be capable of surviving in the virus presence. As a result, transfer of the CCR5 modified T-cells will, at best, temporarily restore patients T-cell immunity and, once

the modified pool of T cells is depleted as a result of cellular senescence, the transfer of modified T cells must be reiterated.^{1,34}

The second approach, as previously referred, is headed directly at targeting and manipulation of CD34⁺ HSCs. Similarly, after cells collection by apheresis, CD34⁺ hematopoietic stem cells are enriched and CCR5 disruption is then accomplished by expression of the respective designer nuclease.¹ The key benefit of this clinical strategy when compared to CD4⁺ T-cell targeting is the aptitude of modified CD34⁺ cells, which constantly differentiate in all HIV susceptible hematopoietic lineages, to engraft and then produce a long-lasting effect.⁸⁸ On the contrary, the clinical disadvantage lies on the fact that stem cells are difficult to manipulate and have a tendency to lose their differentiation potential, when cultured *ex vivo*. In addition, transplantation of HSCs involves a myeloablative preconditioning regimen to eliminate all non-modified HSCs and to, ultimately, grant the right development of modified CD34⁺ cells.⁸⁹

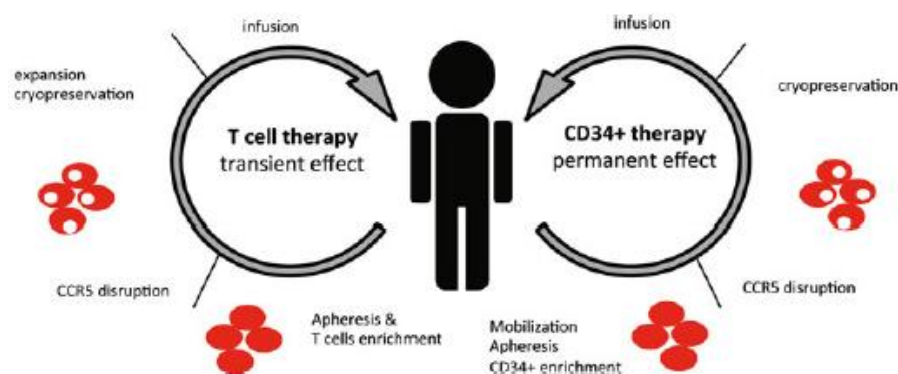


Fig. 4: Clinical application of modified T cells and CD34⁺ cells.¹

6.2 ZFN and TALEN-mediated CCR5 Gene Disruption

6.2.1 Structural Design and Mechanism of Action

Zinc-Finger nucleases (ZFNs) and Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) have developed into a programmable-technology for precise genome editing and so they are redefining the boundaries of biological research.⁸⁵ The Scientific Community define a Zinc Finger (ZNF) as a “small, functional, independently folded domain that requires coordination of one or more zinc ions to stabilize its structure”.⁹⁰ Particularly, ZFNs are engineered endonucleases that contain three functional domains: a DNA-binding zinc-finger protein domain in the N-terminal, a DNA-cleavage domain descendant of the sequence-independent

FokI type IIS restriction enzyme (once found in *Flavobacterium okeanokoites*)⁹¹ in the C-terminal and a short inter-domain linker that joins the latter two domains (Figure 5).⁹²

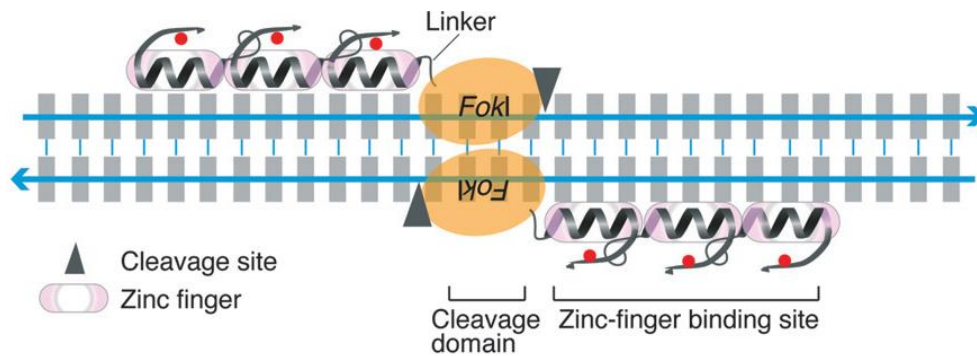


Fig. 5: Structure of a zinc finger nuclease (ZFN).⁹³

Currently, based on the zinc-finger protein domain structure, approximately 30 types of ZNFs are being accepted by HGNC (Gene Nomenclature Committee of The Human Genome Organization).⁹ Generally, a typical zinc-finger domain classically comprises a monomer of three to six zinc-finger modules linked together where, on its turn, each finger module of 30 amino acids precisely recognizes three sequence-specific nucleotides within the DNA targeted site.⁹⁴ Accordingly, two zinc-finger monomers are created to bind to 9–18 nucleotides on reverse sides of the DNA targeted-sequence, on the sense and the antisense strand, maintaining a spacer of 5–7 nucleotides between them (Figure 6-A).⁸² Since each programmed ZFN-pair specifically recognizes 18–36 base pairs,⁹² once changed the identity of its side chains and the amino acids used as contact residues, it is possible to redefine the ZFN-specificity in order to target a unique and defined DNA sequence in the human genome.^{83,92}

Alternatively, the following development of the TALEN system started with a long-term study of *Xanthomonas* genus, due to a co-related pathogenic effect on crops, involving tomatoes, peppers and even rice. Initially, it was established that *Xanthomonas* secreted regulatory proteins into the plant cell cytoplasm, named transcription activator-like effectors (TALEs), which were capable of increasing the pathogen-susceptibility of cells.⁹⁵ Afterward, subsequent protein-studies focusing on TALE-biological behavior revealed their aptitude of binding to DNA and then stimulate the expression of certain genes, mirroring host cell transcription factors.⁷⁹ Identical to ZFN, the TALEN structure also results from the fusion of a DNA-binding domain to the FokI restriction endonuclease that, in turn, also act as a DNA-cleavage domain.⁹⁶ Conversely, as an alternative of using zinc-finger proteins with 30 amino acids *per* module, this genetic approach use TALEs as naturally occurring DNA binding proteins, where each TALE repeat comprises a highly conserved sequence of 33 to 35 (34, usually) amino acids, with divergent 12th and 13th amino acids.⁹⁷ Granting a spacer of 14 to 18

nucleotides a TALEN-custom pair may recognize 30-40 DNA base pairs and attach to opposite sides of target DNA by virtue of the polymorphism at positions 12 and 13 within each module, called 'repeat-variable di-residues' (RVDs).⁹⁸ Consequently, RVDs impose a high binding specificity, due to a straightforward 1:1 code for protein-to DNA interaction (i.e., 1 repeat unit binds to 1 nucleotide) (Figure 6-B). This strict interaction between TALEN-amino acid sequence and DNA-sequence has permitted the development of exact DNA-binding domains by choosing repeat modules arrangement containing the proper RVDs to improve TALEN-targeting specificity.^{98,99}

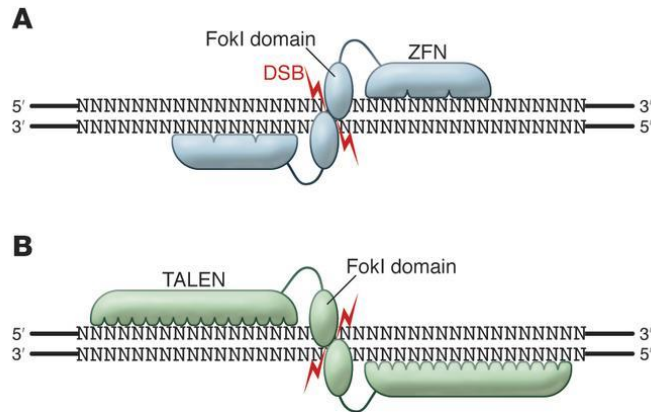


Fig. 6: Binding specificity of ZFNs (A) and TALENs (B).¹⁰⁰

After binding, ZFNs and TALENs perform like designer restriction enzymes, cutting both strands of DNA at the bound target sequence. For this purpose, the cleavage of a target locus requires that two different ZFN and TALEN monomers properly bind at the desired cleavage site as a heterodimer structure, in order to guarantee the specificity advantages of dimerization-dependent cleavage. On the cleavage event,¹⁰¹ the double strand break (DSB) created by designer nucleases is mended by one of two major innate DSB repair pathways: Non-Homologous End Joining (NHEJ) mechanism, which generally occurs throughout all the cell cycle, or Homology-Directed Repair (HDR) mechanism that primarily arises in S and G2 phases.⁹² The HDR repair in which the DSB is authentically reconstructed using a DNA homologous sequence as template, is reliant on higher sequence similarity in order to permit the transfer of genetic information between the donor DNA and the targeted gene.¹⁰² On the other hand, NHEJ pathway is characterized by a simple re-join of the broken DNA ends in an error-prone manner, hence leading to small insertions or deletions (indels) at the DNA break point.⁹⁷

Considering an anti-HIV therapy approach, due to a predominantly NHEJ outcome where a 5-bp duplication at the target site leads to the ORF-introduction of two adjacent stop codons

with subsequent gene and CCR5-disruption, NHEJ pathway appears as the predominant DSB-repair mechanism in mammalian cells.⁸⁵

6.2.2 Refining ZFNs and TALENs: Specificity and Toxicity

Specificity generally stands as “the quality of being clear, particular and exact”.¹⁰³ In terms of designer nucleases, specificity will permanently be a crucial feature in any successful biotechnological or therapeutic application due to its strict correlation with nuclease-activity. In fact, the higher the nuclease specificity, the lower the nuclease off-target cleavage and henceforth associated-toxicity.¹⁰⁴ Several studies highlighted the fact that the existent analogous architecture between ZFNs and TALENs seemed preponderant to achieve a fruitful clinical setting through the development of the following mutual nuclease-criteria:¹⁰⁵

A. High specificity of the DNA-binding domain

The DNA-binding domain is undoubtedly the leading determining factor for nucleases activity and specificity.¹⁰⁵ Different cell-based assays have revealed that ZFN and TALEN subunits that do not encompass a DNA-binding domain with appropriate affinity to the recognition locus will either not find, at any rate, the DNA target site or they will, in any case, bind and cleave similar undesirable genome sequences, leading to refractory toxicity.¹⁰⁶

Off-site targets are characterized as sequences within the genome that comprise few mismatches in comparison to the targeted sequence of interest.⁹² In general, ZFNs can stand up to 8 mismatches per 24-bp along the target site, meaning that each ZFN pair has the ability of binding to an off-target site encompassing only 66% homology with the desirable target.¹⁰⁷ In terms of CCR5 disruption, the key concern derives from the recognition of a high sequence similarity with its homologous locus CCR2. For this purpose, Kim and colleagues found that CCR5-ZFN has the ability to induce CCR2-gene off-target activity when there is only a single mismatch between the targeted CCR5 sequence and CCR2 DNA.¹⁰⁶ However, a further study conducted by Perez and colleagues revealed that the actual existence of two mismatches between CCR5 and CCR2-nucleotide sequences seems sufficient to uphold in 10 times the CCR5 cleavage specificity, making endonuclease activity more reliant on proper DNA binding and so granting a substantial decrease of ZFN-associated toxicity.^{105,106,107} Moreover, ZFN-concentration also appeared as an important factor for off-target cleavage, suggesting that it should be maintained as low as possible to avoid potential clinical failures.¹⁰⁸ It is believable that, at great intranuclear concentrations, a ZFN subunit would bind as a monomer to its recognized 9 to 18-bp target site, becoming mistakenly activated after forming a dimer with a

second ZFN subunit in solution, not properly bound to DNA. Assuming that a 9-bp half-site statistically arises more than 10,000 times in the human genome, this undesirable situation would engender plenty off-target cleavage sites.¹⁰⁵

On the other hand, scientists also considered the TALEN-expression impact on gene editing specificity and off-targeting phenomenon. Similarly, TALENs over-expression by clinical application of high nuclease concentrations may saturate the target site, increasing the off-target editing likelihood.¹⁰⁹ Considering the strong and proper affinity for their targets, TALENs were shown to tolerate up to 5 mismatches in their 19-bp target half-sites and so only can lead to potential off-target events at sites with more than 74% nucleotide identity to the intended target site, which emphasizes TALENs aptitude to combine high cleavage specificity with low cellular cytotoxicity.¹¹⁰ For these reasons, TALENs single-nucleotide precision and their high nuclease activity have increased the scientific interest of searching for novel TALENs designs as a prospective manner of reducing off-target editing.¹¹¹ Only, 4 TALEN-RVDs are being clinical applied and used by most researchers (NI, NG, HD, and NN, which corresponds to DNA Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) and Guanine (G), respectively.¹⁰⁹ However, this genetic code seems degenerate because some RVDs can bind to numerous nucleotides, with different efficiencies. For example, NN-RVD can bind both G and A nucleotides (with a G preference), which have emphasized the development-need of monomers with more specific RVDs. By exploring the 400 combinations of the two key variable amino acids at positions 12 and 13, nonconventional RVDs (ncRVDs) with novel alternative specificity patterns were identified. Accordingly, the suitable ncRVDs implementation would guarantee a proper discrimination between nucleotides at the DNA mismatches positions, preventing the TALEN activity at the off-site sequences while allowing the editing-process on the desired locus.¹¹² As example, unlike ZFN, the CCR5-specific TALEN proved its ability to distinguish between the CCR5 target locus and a respective highly similar site in CCR2.¹⁰⁷ For this purpose, the use of rationally designed nucleases, such as TALEN TC-NC, showed a CCR5:CCR2 TALEN targeting ratio of 130:1 while ZFNs only achieved a low range of 3:1. This ability to discriminate between CCR5 and CCR2 reveals that ncRVD can be used as a key discriminant between highly similar off-target sites to overcome cytotoxic side effects.¹¹⁰

B. Regulated dimerization between DNA-cleavage domains

Even though some cleavage activity by wild-type monomeric FokI was registered *in vitro*, biochemical and biophysical experiences exposed that, at the spacer region, the DNA sequence is more efficiently cleaved by natural FokI enzyme as a homodimer structure, once

both ZNF and TALEN subunits are bound to DNA.¹¹³ Similarly, despite the fact that DNA cleavage by a ZFN or TALEN monomer has been detected *in vitro*, effective induction of a DSB also requires the dimerization of two ZFN and TALEN subunits on the DNA.^{108,113} However, while the natural FokI functions as a homodimer, ZFNs and TALENs are authentic heterodimers and homodimerization of the two identical subunits may enable cleavage at additional non-desirable sites resulting on subsequent off-target activity and toxicity.⁹²

ZFNs and TALENs do not encompass an allosteric mechanism to properly regulate DNA-cleavage. Therefore, two solutions have been considered to significantly reduce the number of nucleases off-target DSBs: decrease the enzyme FokI concentration in solution by applying the lowest nuclease-quantity possible, and redesign the dimer interface by reducing the number of hydrophobic interactions. As a result, the latter approach provides a weakened dimer interface and, ultimately, prevent ZFN dimers from forming in solution and so make endonuclease activity more reliant on proper DNA binding.^{114,115}

C. Rigid interdomain linker

Even though several interdomain ZFN and TALEN linkers with different lengths have been scientifically labelled and tested, no linker has yet been defined as capable of providing perfect specificity for a sole length “spacer” DNA. Therefore, the magnitude of this ambiguity relies on the fact that a pair of ZFNs or TALENs may not only cut at sites with a spacer length of e.g., 6bp, but also at sites with 5-bp and 7-bp spacers, thus increasing the amount of potential off-target cleavage events. In this context, shorter linker variants appeared to be more active and selective, on the one hand, and more restrictive regarding the DNA spacer length, on the other hand.¹¹⁶ Furthermore, systematic analysis of candidate-based linkers or a conjunctive library methodology in which both linker composition and length are randomized, possibly would provide a helpful strategy to categorize linker variants that impose ZFN and TALEN-mediated DNA cleavage at target sites of a single spacer length.¹⁰⁵

D. Efficient nuclease delivery and expression

Currently, the appropriate delivery of editing systems to target specific cell types remains a preeminent clinical challenge. Therefore, a diversity of nucleic acid or protein delivery methods are being tested in order to evaluate their aptitude to successfully apply genome editing nucleases into target cells either *ex vivo*, by modifying and autologously transplanting cells, or *in vivo*, by direct nuclease introduction into body diseased cells.¹¹⁸ In parallel, the principal gene editing delivery strategies may also be separated into viral and non-viral vector systems, where non-viral vector-based studies have prevailed over viral vector-based studies in various gene-

editing therapies studies.¹¹⁹ Assuming that nucleases can theoretically be immunogenic and lead to expected off-target effects, the ideal delivery system should prefer transient nuclease activity to nuclease permanent expression.^{85,118}

Ex vivo editing therapies stand on the principle that target cell population is firstly removed from the body, secondly modified with desirable programmable nucleases and then transplanted back into the original host. When considering possible off-target modifications, this approach reveals an indispensable advantage of granting strict control over the specific nuclease dosage delivered to cells. However, there are two important therapeutic weaknesses: first, target cells must have the ability to survive outside the body and, secondly, when cultured cells suffer re-introduction into a patient body, they often lead to poor engraftment and subsequent decrease of treatment effectiveness.¹²⁰ For *ex vivo* clinical purpose, even though an extensive amount of delivery platforms is clinically available, is the electroporation non-viral system as a traditional physical process that showed to be the most effective *ex vivo* editing method in delivering genetic materials¹²¹ and holding advantages of simplicity, high reproducibility and target specificity with transient systemic delivery.¹²²

On the other hand, *in vivo* genome editing comprises straight delivery of programmable nucleases to target affected cells, right in their native tissues. This therapy have two main advantages over *ex vivo* approaches: first, *in vivo* gene editing methods can be advantageous in diseases where the affected cell population is not acquiesce to *ex vivo* manipulation; second, *in vivo* delivery has the ability to target various tissue types, possibly granting the treatment of diseases that disturb multiple organ systems.¹²³ For *in vivo* therapies, the most encouraging delivery systems are the viral vectors (Annex I). However, the application of viral vectors with defined, tissue-specific tropism, has also its drawbacks and so it is presently restricted in terms of tropism and cargo carrying capacity. Likewise, another expected *in vivo* delivery obstacle relies on the difficultness of controlling the nucleases dosage and distribution in the organism, resulting on off-target events that may be hard to envisage.^{119,122} In particular, Adeno-Associated Viral Vectors (AAVVs) have shown high delivery efficacy for a diversity of tissue types including eye, brain, liver and muscle.¹²⁴ However, the moderately small packaging capacity of AAVVs have revealed some challenges for nuclease delivery. While ZFNs are reasonably small structures, allowing a dimeric ZFN pair to be packaged into a single AAVV,¹²⁵ a dimeric TALEN pair is considerably larger and will likely need to be packaged into two separate AAVVs.¹¹⁸ Contrarily to AAVs, Lentiviral Vectors (LVVs) have relatively large capacity, facilitating the delivery of large nuclease-coding sequences, such as TALENs.¹¹⁹

However, LVV-integration ability can result in undesirable rearrangements within TALEN genes when nucleases are delivered into cells (Annex I).^{1,109,110}

Summing up, viral-vectors can attain higher transduction efficacy and long-term gene expression, but they also encompass critical limitations like immunogenicity, poor target specificity, high price and incapability to carry large size cargos. Non-viral methodologies, on the contrary, have shown high prospective due to advantages such as less toxicity, ability to carry large size genetic material and easy production, offering a prospect alternative in genome editing therapies.^{117,122}

6.3 CRISPR/Cas9 mediated CCR5 Gene Disruption

6.3.1 CRISPR/CAS Discovery as a Remarkable Gene Editing Tool

The aptitude for precise genome manipulation using molecular engineering techniques is essential to propel not only forthcoming science researches but also the development of innovative medical therapies. Not long ago, the gene-editing biotechnological achievement was only possible due to ZFNs and TALENs application, through coupling a clivage domain to customizable protein modules, which recognized DNA in a sequence-specific way.^{75,78} Though these approaches have permitted unparalleled precision in genome manipulation, in practice they have been restricted by the predictability, reproducibility, and specificity of targeted cleavage, all of which are significantly inferable by the nature of protein-mediated DNA sequence recognition.⁸⁵ Later, the discovery of the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and Cas Associated Proteins (CRISPR/Cas) System, in prokaryotes, appeared as the first platform able of directing proteins to their DNA target sites over RNA-DNA interactions, rather than protein-DNA interactions.¹²⁷ Therefore, the simplicity and flexibility of this programmable, multiplexable and scaleable gene editing tool has revolutionized the molecular biology field and engendered excitement for novel and upgraded gene therapies (Annex II).^{76,100}

In 1987, a group of Japanese scientists initially recognized CRISPR in the *Escherichia coli* genome. At the time, CRISPR was noticed as a group of odd palindromic DNA sequences with series of 29-nucleotide repeats separated by singular and not palindromic 32-nucleotide sequences named spacers.¹²⁸ Whereas the length and composition of the intervening spacers differ among species, in 1990, Francisco Mojica discovered that CRISPR arrays themselves were found to be tremendously common, prevailing in 40% of bacterial genomes and 90% of archaeal genomes.¹²⁹ Thus, despite the fact that this similar repeat–spacer–repeat pattern were recognized in phylogenetically diverse organisms, the function of these DNA sequences

remained obscure.¹³⁰ Later, Mojica extracted various spacer sequences from diverse bacteria genomes and inserted them into BLAST, the Basic Local Alignment Search Tool, hoping to interrelate this unidentified spacers with possible known DNA sequences. In fact, the spacers were indeed matched with DNA sequences belonging to bacteriophages, which are casually named as phages, i.e., viruses that infect and replicate within bacteria and Archaea.^{131,132}

Meanwhile, in 2006, the following study of CRISPR occurred in a yogurt production factory where manufacture cultures of *Streptococcus thermophilus* were repeatedly attacked by viruses.¹³³ In this context, in the early 2000s, Philippe Horvath observed that only some strains of *Streptococcus thermophilus* were effectively immune to viral attacks, and decided to carry out several experiments where virus DNA segments were added into the CRISPR loci of non-resistant bacteria clones. After subsequent DNA sequencing, the CRISPR-acquisition of new spacers sequences lead to an increase level of bacteria resistance to further similar infections, revealing that CRISPR was indeed a prokaryotic Adaptive Immune system that provides protection against invading pathogens and grants a genetic memory of the past infections.^{134,135} Additionally, Horvath also identified a group of genes that were associated with CRISPR repeats, and so named CRISPR-associated genes (Cas genes), which persist adjacent to the repeat genes and encode a number of nucleases or helicases which are able to cut or unwind DNA.¹³⁶ Particularly, Cas9 (or "CRISPR-associated protein 9") is a popular enzyme that uses CRISPR sequences as a guide to recognize and cleave specific strands of DNA that are complementary to a specific CRISPR sequence.¹³⁷ Therefore, Cas9 enzymes together with CRISPR sequences form the basis of a technology acknowledged as CRISPR/Cas9, which can be used to a wide variety of applications including basic biological research, development of biotechnology products, and treatment of diseases.^{76,77,78}

Some years later, worldwide scientists began working on CRISPR/Cas9 real world applications and, in 2013, Feng Zhang successfully adapted the CRISPR/Cas9 system for genome editing in mammalian cells, optimizing this system to edit genes with unprecedented level of efficiency and accuracy.^{137,138} Specifically, also in 2013, the CRISPR/Cas9-based approach was first tested in HIV-1/AIDS treatment,¹³⁹ where this gene-editing approach generated CCR5 deletion variants that reiterate the naturally occurring homozygous CCR5 Δ 32 mutation, suggesting that permanent cellular immunization from infection and a functional cure is an actual and arising possibility.¹⁴⁰

6.3.2 How does CRISPR/Cas9 Work? Brief Description.

Up to now, three CRISPR/Cas systems of bacterial and archaeal adaptive immunity have been identified and so divided in CRISPR/Cas type I, II and III. This classification is essentially based on substantial differences between their repeat and spacer sequences and, more specifically, in the presence of a distinctive signature Cas-gene.¹⁴¹

Simply, CRISPR/Cas type I system takes advantage of Cas3 as a signature gene, while CRISPR/Cas type III operates with Cas10 signature gene. On the other hand, type II is the simplest among the CRISPR/Cas systems and only requires Cas9 gene to obtain a single endonuclease for the interference with foreign and target DNA.^{141,142} Therefore, Cas9 gene, the CRISPR/Cas type II signature gene, is originated from *Streptococcus pyogenes* and codifies for the multidomain protein Cas9,¹⁴³ which encompasses both the HNH and RuvC nuclease domains: the HNH domain is a single domain that cleaves the DNA-complementary strand, while the RuvC domain involves three subdomains that, oppositely, are responsible for the noncomplementary DNA-strand cleavage in the target site.^{138,141}

In prokaryotes, the CRISPR/Cas immune process entails three major steps: spacer acquisition (adjustment), CRISPR/Cas transcription (expression), and interference.¹⁴⁴ In spacer acquisition phase, a CRISPR-positive prokaryote is attacked by an unfamiliar virus.¹⁴⁵ Consequently, a 20 bp fragment of the invading DNA, termed protospacer, is taken up by the prokaryote and inserted into its CRISPR locus as a spacer, which fruitfully leads to the memorization of the foreign DNA sequence and then grants host defense against subsequent invasions of the matching intruder.¹⁴⁴ The genomic CRISPR locus is comprised of three main components: the trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) gene, the Cas gene, and the CRISPR array with repeat sequences separated by the casual spacer sequences (Figure 7).¹⁴⁶

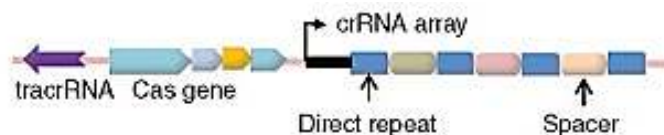


Fig. 7: Schematic representation of CRISPR locus.¹⁴⁶

When the prokaryote suffers second infection by an insistent bacteriophage, the transcription phase initiates, where the CRISPR array, the Cas gene and the tracrRNA are transcribed into pre-crRNA, several proteins (including the Cas9 protein) and tracrRNA, respectively.¹⁴⁷ Following transcription, the pre-crRNA is processed by RNase III into mature CRISPR RNA (crRNA), which then hybridize with tracrRNA via complementary sequences.

Subsequently, the resulting double strand-RNA (tracrRNA-crRNA) is stabilized by Cas9 protein, forming a ribonucleoprotein complex (crRNA:tracrRNA:Cas9) known as the active crRNA-guided endonuclease.^{142,147} After the discovery of this straightforward DNA targeting system it was apprehended that it could be structural modified to achieve a forceful genome editing tool. To simplify the synthesis of this biotechnological system, scientists combined the crRNA and tracrRNA into a single RNA strain, named single guide RNA (sgRNA). Consequently, the sgRNA is therefore organized in a 20 bp sequence at the 5'-end, which corresponds to a spacer sequence, and a hairpin structure at the 3'-end that binds to Cas9 protein.^{144,146} This biotechnological adjustments provides CRISPR/Cas9 system advantages over both TALENs and ZFNs due to the fact that changing DNA targets is as basic as substituting the 20 bp sequence at the sgRNA 5'-end, not requiring any complex cloning or protein engineering and greatly reducing the time needed for gene editing design and implementation.^{138,148} Finally, in the interference phase, the latter ribonucleoprotein complex (sgRNA:Cas9) moves along target DNA and searches for a particular Protospacer Adjacent Motif (PAM). The PAM sequence is positioned upstream of the DNA target site and is crucial for CRISPR-Cas9 correct functioning. In fact, PAM typically encrypts a trinucleotide NGG (5'-NGG-3') sequence, where N characterizes any of the four existent nucleotides and G specifies the guanine nucleotide. After identifying the PAM sequence, the sgRNA:Cas9 complex binds to the subsequent DNA target via Watson and Crick complementary base pairing.¹⁴⁹ Notably, if the complex finds a PAM sequence but the DNA/RNA complementarity requirement is not fulfilled, the Cas9/sgRNA complex persists scanning within the DNA sequence. Similarly, the complex continues to scan if DNA/RNA complementarity is established but there is no PAM sequence preceding the target.¹⁵⁰ As a result, when the two conditions of sgRNA-targeting PAM and correct base pair complementary are satisfied, the sgRNA:Cas9 complex will be able to discontinue the scanning process in order to induce a DNA-DSB at the proper position.^{137,143} Thereupon, similarly to ZFNs and TALENs approaches, Cas9-generated sitespecific DNA-DSBs are later repaired by homologous directed repair (HDR) if the homologous sequences are available or otherwise by non-homologous endjoining (NHEJ), depending on the therapeutical purpose.^{92,97,102} Particularly in HIV treatment, the rationale for gRNA selection must consider having a strict homology to the CCR5-gene ORF in order to successfully lead to predictable Cas9-DSB and subsequent cellular repair mechanisms on the target site, which can therefore promote a frameshift mutation in the CCR5 sequence and thereby result in complete gene disruption.¹⁵¹ Another CRISPR/Cas9 potential advantage relies in its multiplex ability, i.e., ability to apply multiple RNA guides in order to simultaneously

target multiple sites within the same cell.⁷⁶ This aspect facilitates a forthright aptitude to proper mutate or insert multiple genes at once in a genomic region, which can be beneficial due to CRISPR/Cas9 ability to successfully modulate an array of disease-causing genetic elements.¹³⁸ In parallel, novel experiments are being conducted due to Cas9 nuclease ability, when coupled with the precise sgRNA, to effectively target the HIV provirus and therefore facilitate integrated viral genome excision and disruption, guaranteeing subsequent cellular HIV-resistance.¹⁴⁶

6.3.3 Increasing CRISPR/Cas9 Specificity

Specificity is an intrinsic nuclease characteristic of overriding importance when introducing permanent genomic alterations, principally for exceedingly sensitive applications such as gene therapy or other studies directed to associate causal genetic variants with disease phenotypes and biological processes.¹⁰⁰ CRISPR/Cas9 system evolved from prokaryotes relatively small genomes to recent application in larger mammalian cells and therefore, due to its fruitful demonstration for genome editing, this recent biotechnological approach has enhanced researches across numerous clinical fields.^{138,142} In fact, concerning CRISPR/Cas9 therapeutic applications such as CCR5-disruption in HIV, even the simplest and unexpected CRISPR/Cas9 modification might have deleterious effects, which may restrict not only the safety of the treatment but also the survival of the patient himself.¹³⁹ As initial consideration, by simply reducing the delivery sgRNA and Cas9 concentration, a strong decrease of CRISPR/Cas9 off-target effect was verified, similarly to ZFNs and TALENs approaches.¹⁵⁰ However, despite the fact that the cost-effectiveness CRISPR/Cas9 system has raised a noticeable promise for site-specific gene editing, there are other factors that may disturb its specificity and, consequently, its renowned efficacy, which must be carefully addressed, namely: delivery approaches, specificity of binding and development of new variants.^{132,138}

A. Delivery Approaches for CRISPR/Cas9

Vehicles used to deliver the CRISPR/Cas9 gene editing system can be labelled into three common groups: physical delivery, viral vectors, and non-viral vectors. While the most frequent physical delivery methods are microinjection and electroporation, viral delivery vectors have appeared as the most common CRISPR/Cas9 delivery vectors for *in vivo* approaches, including Adeno-viral vectors (AdVVs), AAVs and LVVs (Annex I).¹⁵² Lastly, although non-viral vector delivery methods (including systems such as lipid nanoparticles and DNA 'nanoclews') arise as an escalating area of research, they have not been yet demonstrated

in the literature as appropriate to CRISPR/Cas9 delivery, and therefore this review will only focus on the impact of the first two gene editing delivery approaches to successfully achieve the proper designer nuclease activity on target cells.¹⁵³

A I. Physical Delivery Methods

Firstly, the microinjection method with delivery efficiencies of nearly 100%, have been indicated as the 'gold standard' technique for *in vitro* introduction of CRISPR/Cas9 components into target cells.¹⁵² Particularly, taking advantage of a simple microscope and a 0.5–5.0 µm diameter needle, a cell membrane is perforated to direct deliver the cargoes to a target site within the cell.¹⁵⁴ Positively, microinjection have two main advantages: is not restricted by the cargo molecular weight, which is a significant limiting factor associated with viral vector delivery systems, and allows for the meticulous delivery of desirable cargo quantities, refining the off-target effects control. However, with microinjection methodology, only one cell would be targeted per injection, which can be harmful and totally undesirable for the patient himself when the delivery is optimized by *in vivo* approaches. Likewise, the injection per se can damage target cells and then result in unpredictable high mortality cellular rates.¹⁵⁵ Secondly, the electroporation technique operates with pulsed high-voltage electrical currents in order to transiently open nanometer-sized pores within the cellular membrane, and then permitting CRISPR/Cas9 components, with nanometer diameters, to flow into the cell.¹⁵⁶ This delivery process can efficiently transfer cargo into cells that are conventionally hard to manipulate, being most normally used in an *in vitro* setting. Due to the oftentimes-large quantities of voltage needed to be applied across cell membranes, electroporation is also generally not appropriate for *in vivo* applications.¹²¹

A II. Viral Vectors Delivery

The major difference between LV/AdV delivery and AAV delivery is the size of the vehicle particle itself: LVVs and AdVs are approximately 80–100 nm in diameter, granting an easier package of the CRISPR/Cas9 large components, which contrasts with the minor AAVV 20nm diameter.^{122,147} Therefore, the main problem relies on the fact that SpCas9 is approximately 4.2kb in size, while the AAV general size (~20 nm) merely allows for the packaging of ~4.5–5kb genomic material. This, therefore, results on the AAV inability to effectively include the sgRNA:Cas9 complex along with other elements (such as fluorescent tags), which would successfully ensure the control of CRISPR/Cas9 components to cells.^{157,152} In this context, recent studies have shown the genetic-usage benefits of a different Cas9 protein from an

alternative bacteria specie: Cas9 from *Staphylococcus aureus* is approximately 70% of the *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) size, while retaining the ability to achieve high levels of cleavage.¹⁵⁸ As a result, the sgRNA, the smaller Cas9 protein and other useful components can be favorably combined in a single AAVV, allowing for high efficiency transduction and editing.^{119,152}

In addition, AAVVs e AdvVs, unlike LVVs, do not integrate into the genome and so assume a valuable characteristic for CRISPR/Cas9-based editing by limiting possible off-target effects.^{119,125} However, both LVs and Adv delivery systems are known to possible elicit safety health problems and so careful is required while utilizing them in a therapeutic genome editing approach.^{123,159}

B. Specificity of sgRNA:Cas9 Binding

The success of a clinical experiment comprising the CRISPR/Cas9 system requires the accurate and efficient definition of the target gene location, hinging on the proper recognition of the optimal target-site and subsequent design of a desirable complementary gRNA sequence,¹²⁸ which therefore aims to maximize on-target activity (guide efficiency) while minimizing potential off-target effects (guide specificity).¹³⁹

PAM sequence have proved to be an imperative factor in sgRNA binding and consequent sgRNA:Cas9 activity. Generally, the most common PAM used by SpCas9 systems is 5' NGG 3'. However, recent studies have suggested that the CRISPR type II system may also recognize the trinucleotide 5' NAG 3' as the PAM sequence, although with only one-fifth of the binding efficiency compared to NGG.¹⁶⁰ In this context, the binding frequency of each PAM base was evaluated and important results were observed: the first nucleotide is indeed the least conserved, with G existing in closely 50% of binding sites, while the second position with G nucleotide persists in more than 90% of the binding sites, suggesting that NAG is not the optimal PAM for the designing of CRISPR/Cas9 sequences.¹⁶¹ Nonetheless, in practice, the canonical NGG sequence may not be available within the target genomic locus and researchers cannot afford to be restricted by the presence of this specific PAM sequence to continue their CRISPR experiments. In this cases, not only the 5' NAG 3' PAM sequence assumes an extreme importance, but also the usage of different PAM sequences that can be recognized by different Cas endonucleases isolated from different bacterial species. As a result, scientists may always have the option of selecting diverse nucleases whose corresponding PAM would be effectively present in the target genome.^{149,160,161}

Several authors also reported that appropriate design of a sgRNA sequence must include the nucleotide guanine as the first base of the sgRNA sequence and so acting as the closest nucleotide to the PAM sequence. Contrariwise, there is a predilection for cytosine, but not guanine, at position 5 that is fifth base proximal to PAM. These design principles are established upon the theory that guanine-rich sequences can fold into stable noncanonical structures called G-quadruplexes *in vivo*, which contributes to sgRNA overall stability.^{148,161} It has also been reported that effective sgRNAs can be selected according to its GC content, where it has been conveyed that an increased GC content (from 40% to 60%) may improve sgRNA-DNA proper hybridization and efficient on-target cleavage, while a higher level of off-target events persist in sequences with a lower GC content (less than 30%).¹⁶²

C. Development of Cas9 Variants

Wild-type Cas9 has two nuclease domains, each of which cut one DNA strand. Alternatively, in a dimer system, both domains must bind to their 'half-sites' or specific targets and then dimerize in order to initiate proper cleavage with reduced off-target effects probability.¹⁰¹ For this purpose, an innovative method that combines the reliability of ZFNs and TALENs dimerization-dependent FokI nuclease domains, with the straightforwardness of CRISPR/Cas9 system has been developed. Theoretically, researchers fused the FokI nuclease to a CRISPR complex comprising an inactive Cas9 nuclease (FokI-dCas9). Therefore, the sgRNA leads the CRISPR complex to the target site but the 'cut' is only made by the dimerized form of FokI. As a result, it is predictable that the FokI-dCas9 strategy would reduce measurable off-target effects in a 10,000 fold rate, which makes it effective for clinical approaches requiring highly precision and specific genome editing.^{149,163}

Researchers have also found alternative Cas proteins for genome modification. For example, new types of Cas9 from differing species have been studied and revealed increased specificity without compromising the on-target effectivity, when compared to SpCas9.^{143,161} As example, scientists emphasized the Cas9 protein from *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Neisseria meningitidis* (NmCas9) and *Streptococcus thermophilus* (StI Cas9), which all interact with variable PAM sequences and then lead to distinct gene-editing activity.¹²⁸ Specific Cas9 ortholog selection may guarantee value-added gene editing efficiency and so should be considered as part of a gene editing system design.¹⁴⁷

7. Conclusion

Currently, HIV/AIDS persists as a severe health problem worldwide. Data from World Health Organization (WHO) revealed that, by the end of 2018, about 37.9 million people were living with HIV and approximately 1.7 million individuals were registered as newly infected. Interestingly, near 62% of infected patients (around 23.3 million people) have received combination antiretroviral therapy, which continues the main therapeutic strategy to reduce HIV-related morbidity and mortality.¹⁶⁴ However, over the years, the aptitude to modify complex genomes with designer nucleases has had a noteworthy impact on biotechnology, basic research and human gene therapy. It has propelled unparalleled methods to dissect gene function in model organisms and guaranteed innovative opportunities for personalized therapy of inherited or acquired disorders, including HIV.^{75,76}

Until March of 2019, the Berlin Patient was the only individual ever to be HIV/AIDS “cured”. However, in a recent report published by the journal Nature, a group of investigators proclaimed the cure of a second HIV-positive patient, thus named the “London patient”. Fortunately, both patients shared comparable medical conditions: they were HIV-1 positive receiving cART therapy, developed a blood cancer (acute myeloid leukemia and Hodgkin’s lymphoma, respectively), experienced a precise conditioning regimen before receiving bone marrow transplant from a donor who was homozygous for the CCR5 Δ 32 mutation in the gene encoding the CCR5 HIV co-receptor, and both passed from graft-versus-host disease, which may have contributed to the complete loss of HIV-infected cells. The only difference between the treatment approaches relies on the fact that the Berlin patient experienced a cancer relapse after his first transplant, requiring a second bone marrow transplant and a more aggressive conditioning regimen of immunosuppressive drugs, chemotherapy and total body irradiation. In contrast, the cancer of London patient went into full remission after just one bone marrow transplant. Nowadays, the London patient is still HIV virus-free after 18 months of cART-absence proving that, as hoped, both patients were effectively cancer and HIV cured.^{165,166,167}

"By achieving remission in a second patient using a similar approach, we have shown that the Berlin Patient was not an anomaly and that it really was the treatment approaches that eliminated HIV in these two people" and "We haven't cured HIV, but (this) gives us hope that it's going to be feasible one day to eliminate the virus. We need to understand if we could knock out this (CCR5) receptor among people with HIV, which may be possible with gene therapy approaches" said Ravindra Gupta, lead author of the study and professor in University

College London's Division of Infection and Immunity, offering hope for new treatment strategies, including designer nucleases gene therapies.¹⁶⁸

ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas9 revolutionized the HIV gene therapy field by providing powerful means to effectively disrupt CCR5 as a major coreceptor for HIV cell-entry.^{67,70} Therefore, due to these up-to-date gene-editing approaches focusing on a functional rather than a sterilizing cure, several clinical trials are being performed to envision novel treatment approaches, where patients can be taken off classical antiretroviral treatment and still be able to successively suppress viral replication with their own manipulated immune system.⁶ However, numerous vital designer nucleases optimizations must be overtaken before applying these gene therapy approaches to a wide range of HIV-infected patients, including the editing inefficiency, the imperfect delivery systems, the off-target editing consequences, the unpredictable persistence of gene-modified cells and the high cost of editing therapies.^{68,71,85}

Recent advances in high efficiency genome editing have also encouraged the future use of targeted nucleases to permanently disrupt the CXCR4 coreceptor and the proviral genome in infected cells. As mentioned, CCR5 functions as the HIV-entry predominant co-receptor through early stages of infection. However, once HIV-1 infection is further established, the virus has the ability to select CXCR4 as an alternative co-receptor. Furthermore, with CXCR4 tropic viruses emergence, CCR5 disruption will no longer be sufficient to effectively protect against the HIV-1 spread within the patient.^{6,118,120} On this purpose, targeted CXCR4 disruption is also being considered as a supplementary designer nuclease strategy for inhibiting HIV-1 infection, even though CXCR4 reveals an important role in immune regulation, especially in B cell development, raising disruption concerns of potential deleterious effects.¹ In parallel, in order to eradicate the virus from already infected cells, several attempts are also being performed to eliminate HIV proviral DNA using ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9 technology.^{169,170,171} Therefore, as quoted by the Plant Biotechnology Journal, “In the light of human ingenuity and the speed with which that ingenuity can drive scientific progress, it is difficult to project what the future will bring. The only certainty is that such progress will come”.¹⁷²

8. References

1. BERKHOUT, B., ERTL, H.C.J., WEINBERG, M.S. - **Gene Therapy for HIV and Chronic Infections**. American Society of Gene & Cell Therapy. 2015. ISBN 978-1-4939-2431-8.
2. DENG, Q., CHEN, Z., SHI, L., LIN, H. - **Developmental Progress of CRISPR/Cas9 and Its Therapeutic Applications for HIV-1 Infection**. *Reviews in Medical Virology*. 28, 5 (2018).
3. NYAMWEYA, S., HEGEDUS, A., JAYE, A., ROWLAND-JONES, S., FLANAGAN, K.L., MACALLAN, D.C. - **Comparing HIV-1 and HIV-2 Infection: Lessons for Viral Immunopathogenesis**. *Reviews in Medical Virology*. 23, 4 (2013) 221–240.
4. WANG, J., HOLMES, M.C. - **Engineering Hematopoietic Stem Cells Toward a Functional Cure of Human Immunodeficiency Virus Infection**. *Cytherapy*. 18, 11 (2016) 1370–1381.
5. MEHTA, V., CHANDRAMOHAN, D., AGARWAL, S. - **Genetic Modulation Therapy Through Stem Cell Transplantation for Human Immunodeficiency Virus-1 Infection**. *Cureus*. 9, 3 (2017).
6. HUYGHE, J., MAGDALENA, S., VANDEKERCKHOVE, L. - **Fight Fire with Fire: Gene Therapy Strategies to Cure HIV**. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 15, 8 (2017) 747–758.
7. MANJUNATH, N., YI, G., DANG, Y., SHANKAR, P. - **Newer Gene Editing Technologies Toward HIV Gene Therapy**. *Viruses*. 5, 11 (2013) 2748–2766.
8. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV drug resistance** [Accessed January 11, 2019]. Available at: <https://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/en/>
9. HOXIE, J.A., JUNE, C.H. - **Novel Cell and Gene Therapies for HIV**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2, 10 (2012).
10. BRELOT, A., CHAKRABARTI, L.A. - **CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis**. *Journal of Molecular Biology*. 430, 17 (2018) 2557–2589.
11. SCIENCE DAILY. **Virus** [Accessed January 13, 2019]. Available at: <https://www.sciencedaily.com/terms/virus.htm>
12. AIDS INFO. **The HIV Life Cycle** [Accessed January 13, 2019]. Available at: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/73/the-hiv-life-cycle>
13. KIRCHHOFF, F. - **HIV Life Cycle: Overview**. *Encyclopedia of AIDS*. (2013) 1-9.

14. BARMANIA, F., PEPPER, M.S. - **C-C Chemokine Receptor Type Five (CCR5): An Emerging Target for the Control of HIV Infection.** *Applied & Translational Genomics.* 2 (2013) 3–16.
15. SHI, B., LI, J., SHI, X., JIA, W., WEN, Y., HU, X., ZHUANG, F., XI, J., ZHANG, L. - **TALEN-Mediated Knockout of CCR5 Confers Protection Against Infection of Human Immunodeficiency Virus.** *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 74, 2 (2017) 229–241.
16. ENGELMAN, A., CHEREPANOV, P. - **The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights.** *Nature Reviews Microbiology.* 10, 4 (2012) 279–290.
17. CRAIGIE, R., BUSHMAN, F. D. - **HIV DNA Integration.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2, 7 (2012).
18. LODOWSKI, D. T., PALCZEWSKI, K. - **Chemokine Receptors and other G Protein-Coupled Receptors.** *Current Opinion in HIV and AIDS.* 4, 2 (2009) 88–95.
19. LU, M., WU, B. - **Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors.** *IUBMB Life.* 68, 11 (2016) 894–903.
20. HU, G.-M., MAI, T.-L., CHEN, C.-M. - **Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution.** *Scientific Reports.* 7, 1 (2017).
21. GUIDE TO PHARMACOLOGY. **G Protein-Coupled Receptors** [Accessed January 19, 2019]. Available at: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=694>
22. ROSENBAUM, D. M., RASMUSSEN, S. G. F., KOBILKA, B. K. - **The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors.** *Nature.* 459, 7245 (2009) 356–363.
23. ALLEN, S. J., CROWN, S. E., HANDEL, T. M. - **Chemokine: Receptor Structure, Interactions, and Antagonism.** *Annual Review of Immunology.* 25, 1 (2007) 787–820.
24. HUGHES, C. E., NIBBS, R. J. B. - **A Guide to Chemokines and their Receptors.** *The FEBS Journal.* 285, 16 (2018) 2944–2971.
25. ZLOTNIK, A., YOSHIE, O., NOMIYAMA, H. - **The Chemokine and Chemokine Receptor Superfamilies and their Molecular Evolution.** *Genome Biology.* 7, 243 (2006).
26. CARTIER, L., HARTLEY, O., DUBOIS-DAUPHIN, M., KRAUSE, K.-H. - **Chemokine Receptors in the Central Nervous System: Role in Brain Inflammation and Neurodegenerative Diseases.** *Brain Research Reviews.* 48, 1 (2005) 16–42.

27. NOMIYAMA, H., OSADA, N., YOSHIE, O. - **Systematic Classification of Vertebrate Chemokines based on Conserved Synteny and Evolutionary History.** *Genes to Cells.* 18, 1 (2012) 1–16.
28. ZHANG, M., ZHU, Z.-L., GAO, X.-L., WU, J.-S., LIANG, X.-H., TANG, Y.-L. - **Functions of Chemokines in the Perineural Invasion of Tumors.** *International Journal of Oncology.* 52, 5 (2018) 1019–6439.
29. ALLERS, K., SCHNEIDER, T. - **CCR5 Δ 32 Mutation and HIV Infection: Basis for Curative HIV Therapy.** *Current Opinion in Virology.* 14 (2015) 24–29.
30. BACHELERIE, F., BEN-BARUCH, A., BURKHARDT, A. M., COMBADIÈRE, C., FARBER, J. M., GRAHAM, G. J., HORUK, R., SPARRE-ULRICH, A. H., LOCATI, M., LUSTER, A. D., MANTOVANI, A., MATSUSHIMA, K., MURPHY, P. M., NIBBS, R., NOMIYAMA, H., POWER, C. A., PROUDFOOT, A. E. I., ROSENKILDE, M. M., ROT, A., SOZZANI, S., THELEN, M., YOSHIE, O., ZLOTNIK, A. - **International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors.** *Pharmacological Reviews.* 66, 1 (2014) 1–79.
31. PAKIANATHAN, D. R., KUTA, E. G., ARTIS, D. R., SKELTON, N. J., HÉBERT, C. A. - **Distinct but Overlapping Epitopes for the Interaction of a CC-Chemokine with CCR1, CCR3, and CCR5.** *Biochemistry.* 36, 32 (1997) 9642.
32. BLANPAIN, C., MIGEOTTE, I., LEE, B., VAKILI, J., DORANZ, B. J., GOVAERTS, C., VASSART, G., DOMS, R. W., PARMENTIER, M. - **CCR5 Binds Multiple CC-Chemokines: MCP-3 Acts as a Natural Antagonist.** *Blood.* 94 (1999) 1899–905.
33. SAMSON, M., LABBE, O., MOLLEREAU, C., VASSART, G., PARMENTIER, M. - **Molecular Cloning and Functional Expression of a New Human CC-Chemokine Receptor Gene†.** *Biochemistry.* 35, 11 (1996) 3362–3367.
34. ROTTMAN, J.B., GANLEY, K.P., WILLIAMS, K., WU, L., MACKAY, C.R., RINGLER, D.J. - **Cellular Localization of the Chemokine Receptor CCR5. Correlation to Cellular Targets of HIV-1 Infection.** *The American Journal of Pathology.* 151, 5 (1997) 1341–1351.
35. MUMMIDI, S., ADAMS, L. M., VANCOMPERNOLLE, S. E., KALKONDE, M., CAMARGO, J. F., KULKARNI, H., BELLINGER, A. S., BONELLO, G., TAGOH, H., AHUJA, S. S., UNUTMAZ, D., AHUJA, S. K. - **Production of Specific mRNA Transcripts, Usage of an Alternate Promoter, and Octamer - Binding Transcription Factors Influence the Surface Expression Levels of the HIV**

- Coreceptor CCR5 on Primary T Cells.** *The Journal of Immunology.* 178, 9 (2007) 5668–568.
36. HOOVER, K. C. - **Intragenus Variation in a Chemokine Receptor Gene (CCR5) in Homo.** *BioRxiv - The Preprint Server for Biology.* (2017).
 37. MUMMIDI, S., AHUJA, S.S., MCDANIEL, B.L., AHUJA, S.K. - **The Human CC Chemokine Receptor 5 (CCR5). Gene-Multiple Transcripts with 59-End Heterogeneity, Dual Promoter Usage, and Evidence for Polymorphisms within the Regulatory Regions and Noncoding Exons.** *Journal of Biological Chemistry.* 272 (1997) 30662–30671.
 38. PICTON, A. C. P., PAXIMADIS, M., TIEMESSEN, C. T. - **Genetic Variation within the Gene Encoding the HIV-I CCR5 Coreceptor in Two South African Populations.** *Infection, Genetics and Evolution.* 10, 4 (2010) 487–494.
 39. LIU, R.I., PAXTON, W.A., CHOE, S., CERADINI, D., MARTIN, S.R., HORUK, R., MACDONALD, M.E., STUHLMANN, H., KOUP, R.A., LANDAU, N.R. - **Homozygous Defect in HIV-I Coreceptor Accounts for Resistance of some Multiply-Exposed Individuals to HIV-I Infection.** *Cell.* 86 (1996) 367–377.
 40. HEYDARIFARD, Z., TABARRAEI, A., MORADI, A. - **Polymorphisms in CCR5Δ32 and Risk of HIV-I Infection in the Southeast of Caspian Sea, Iran.** *Disease Markers.* (2017) 1–5.
 41. AGRAWAL, L., LU, X., QINGWEN, J., VANHORN-ALI, Z., NICOLESCU, I. V., MCDERMOTT, D. H., MURPHY, P. M., ALKHATIB, G. - **Role for CCR5 32 Protein in Resistance to R5, R5X4, and X4 Human Immunodeficiency Virus Type I in Primary CD4+ Cells.** *Journal of Virology.* 78, 5 (2004) 2277–2287.
 42. SAMSON, M.I., LIBERT, F., DORANZ, B.J., RUCKER, J., LIESNARD, C., FARBER, C.M., SARAGOSTI, S, LAPOUMEROUILLIE, C., COGNAUX, J., FORCEILLE, C., MUYLDERMANS, G., VERHOFSTEDDE, C., BURTONBOY, G., GEORGES, M., IMAI, T., RANA, S., YI, Y., SMYTH, R.J., COLLMAN, R.G., DOMS, R.W., VASSART, G., PARMENTIER, M. - **Resistance to HIV-I Infection in Caucasian Individuals Bearing Mutant Alleles of the CCR5 Chemokine Receptor Gene.** *Nature.* 382 (1996).
 43. XIE, Y., ZHAN, S., GE, W., TANG, P. - **The Potential Risks of C-C Chemokine Receptor 5-Edited Babies in Bone Development.** *Bone Research.* 4 (2019).
 44. DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C., HUTTLEY, G.A., SMITH, M.W., ALLIKMETS, R., GOEDERT, J.J., BUCHBINDER, S.P., VITTINGHOFF, E., GOMPERS,

- E., DONFIELD, S., VLAHOV, D., KASLOW, R., SAAH, A., RINALDO, C., DETELS, R., O'BRIEN, S.J. - **Genetic Restriction of HIV-I Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CCR5 Structural Gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study.** *Science*. 273 (1996) 1856–1862.
45. SMOLEŃ-DZIRBA, J., ROSIŃSKA, M., JANIEC, J., BENIOWSKI, M., CYCOŃ, M., BRATOSIEWICZ-WASIK, J., WASIK, T. J. - **HIV-I Infection in Persons Homozygous for CCR5-Δ32 Allele: The Next Case and the Review.** *AIDS Reviews*. 19 (2017) 219–230.
46. HÜTTER, G., NOWAK, D., MOSSNER, M., GANEPOLA, S., MÜBIG, A., ALLERS, K., SCHNEIDER, T., HOFMANN, J., KÜCHERER, C., BLAU, O., BLAU, I.W., HOFMANN, W.K., THIEL, E. - **Long-Term Control of HIV by CCR5Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation.** *New England Journal of Medicine*. 360, 7 (2009) 692–698.
47. HÜTTER, G. - **Stem cell Transplantation in Strategies for Curing HIV/AIDS.** *AIDS Research and Therapy*. 13, 1 (2016).
48. KURITZKES, D.R. - **Hematopoietic Stem Cell Transplantation for HIV Cure.** *The Journal of Clinical Investigation*. 126, 2 (2016) 432–437.
49. ALLERS K., HÜTTER G., HOFMANN J., LODDENKEMPER C., RIEGER K., THIEL E., SCHNEIDER T. - **Evidence for the Cure of HIV Infection by CCR5Delta32/Delta32 Stem Cell Transplantation.** *Blood*. 117 (2011) 2791–2799.
50. HÜTTER, G., THIEL, E. - **Allogeneic Transplantation of CCR5-Deficient Progenitor Cells in a Patient with HIV Infection: an Update After 3 Years and the Search for Patient no. 2.** *AIDS*. 25, 2 (2011) 273–274.
51. CHHABRA, A., RING, A.M., WEISKOPF, K., SCHNORR, P.J., GORDON, S., LE, A.C., KWON, H.-S., RING, N.G., VOLKMER, J., HO, P.Y., TSENG, S., WEISSMAN, I.L., SHIZURU, J.A. - **Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Immunocompetent Hosts without Radiation or Chemotherapy.** *Science Translational Medicine*. 8, 351 (2016) 351ra105–351ra105.
52. FRED HUTCH. **Timothy Ray Brown: the Accidental AIDS Icon** [Accessed february 14, 2019]. Available at: <http://www.fredhutch.org/en/news/center-news/2015/02/aids-icon-timothy-ray-brown.html>

53. REZVANI, A. R., STORB R. F. - **Prevention of Graft-vs.-Host Disease.** Expert Opinion on Pharmacotherapy. 13, 12 (2012) 1737–1750.
54. BURKE, B., BOYD, M., IMPEY, H., BRETON, L., BARTLETT, J., SYMONDS, G., HÜTTER, G. - **CCR5 as a Natural and Modulated Target for Inhibition of HIV.** Viruses. 6, 1 (2013) 54–68.
55. NOVEMBRE, J., GALVANI, A.P., SLATKIN, M. - **The Geographic Spread of the CCR5 Delta32 HIV-Resistance Allele.** PLOS Biology: A Peer-Reviewed Open-Access Journal. 3 (2005) e339.
56. KORDELAS, L., VERHEYEN, J., ESSER, S. - **Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32 Mutation.** New England Journal of Medicine. 371, 9 (2014) 880–882.
57. DOMINGO, E., SHELDON, J., PERALES, C. - **Viral Quasispecies Evolution.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2, 76 (2012) 159–216.
58. VIRGINIA CANCER INSTITUTE. **Complications Or Side Effects Of Allogeneic Stem Cell Transplant** [Accessed february 20, 2019]. Available at: <https://www.vacancer.com/diagnosis-and-treatment/stem-cell-transplantation/allogeneic-stem-cell-transplant/complications-or-side-effects-of-allogeneic-stem-cell-transplant/>
59. HYDE, C.L., MACLNNES, A., SANDERS, F.A., THOMPSON, J.F., MAZZARELLA, R.A., FAERGEMAN, O., LIRA, M., WIJK, D., WOOD, L., PACIGA, S. A. - **Genetic Association of the CCR5 Region With Lipid Levels in At-Risk Cardiovascular Patients.** Circulation: Cardiovascular Genetics. 3, 2 (2010) 162–168.
60. KLEIN, R. S. - **A Moving Target: The Multiple Roles of CCR5 in Infectious Diseases.** The Journal of Infectious Diseases. 197, 2 (2008) 183–186.
61. GLASS, W.G., LIM, J.K., CHOLERA, R., PLETNEV, A.G., GAO, J.-L., MURPHY, P.M. - **Chemokine Receptor CCR5 Promotes Leukocyte Trafficking to the Brain and Survival in West Nile virus Infection.** The Journal of Experimental Medicine. 202, 8 (2005) 1087.
62. KINDBERG, E., MICKIENĚ, A., AX, C., ÅKERLIND, B., VENE, S., LINDQUIST, L., LUNDKVIST, Å., SVENSSON, L. - **A Deletion in the Chemokine Receptor 5(CCR5) Gene Is Associated with Tickborne Encephalitis.** The Journal of Infectious Diseases. 197, 2 (2008) 266–269.

63. HOUSES OF PARLIAMENT. **Genome Editing** [Accessed march 12, 2019]. Available at: <https://researchbriefings.files.parliament.uk/documents/POST-PN-0541/POST-PN-0541.pdf>
64. GONÇALVES, G. A. R., PAIVA, R. de M. A. - **Gene Therapy: Advances, Challenges and Perspectives**. Einstein (São Paulo). 15, 3 (2017) 369–375.
65. REES, H. A., LIU, D. R. - **Base Editing: Precision Chemistry on the Genome and Transcriptome of Living Cells**. Nature Reviews Genetics. (2018).
66. amfAR, MAKING AIDS HISTORY. **The Countdown to a Cure for AIDS** [Accessed march 15, 2019]. Available at: <https://www.amfar.org/countdown/>
67. STAN, R., ZAIA, J. A. - **Practical Considerations in Gene Therapy for HIV Cure**. Current HIV/AIDS Reports. 11, 1 (2014) 11–19.
68. The International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure - **Towards an HIV cure: a global scientific strategy**. Nature Reviews Immunology. 12, 8 (2012) 607–614.
69. CHUN, T.-W., MOIR, S., FAUCI, A. S. - **HIV Reservoirs as Obstacles and Opportunities for an HIV Cure**. Nature Immunology. 16, 6 (2015) 584–589.
70. NAZARI, R., JOSHI S. - **CCR5 as Target for HIV-1 Gene Therapy**. Current Gene Therapy. 8 (2008) 264–272.
71. TELENTI, A. - **Safety Concerns about CCR5 as an Antiviral Target**. Current Opinion in HIV and AIDS. 4, 2 (2009) 131–135.
72. ZHOU, Y., KURIHARA, T., RYSECK, R. P., YANG, Y., RYAN, C., LOY, J., WARR, G., BRAVO, R. - **Impaired Macrophage Function and Enhanced T Cell-Dependent Immune Response in Mice Lacking CCR5, the Mouse Homologue of the Major HIV-1 Coreceptor**. Journal of Immunology. 160 (1998) 4018–25.
73. SAHA, S. K., SAIKOT, F. K., RAHMAN, M. S., HENAMOSTOFA JAMAL, M. A., RAHMAN, S. M. K., ISLAM, S. M. R., KIM, K.-H. - **Programmable Molecular Scissors: Applications of a New Tool for Genome Editing in Biotech**. Molecular Therapy - Nucleic Acids. (2018).
74. THE NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING AND MEDICINE. - **Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance: Somatic Genome Editing**. Washington, D.C., EUA: National Academies Press, 2017. ISBN: 0309452880.

75. WANG, C. X., CANNON, P. M. - **The clinical applications of genome editing in HIV.** *Blood.* 127, 21 (2016) 2546–2552.
76. CORRIGAN-CURAY, J., O'REILLY, M., KOHN, D. B., CANNON, P. M., BAO G., BUSHMAN F. D., CARROLL, D., CATHOMEN, T., JOUNG, J. K., ROTH D., SADELAIN, M., SCHARENBERG, A. M., VON KALLE, C., ZHANG F., JAMBOU, R., ROSENTHAL, E., HASSANI, M., SINGH, A., PORTEUS, M. H. - **Genome Editing Technologies: Defining a Path to Clinic.** *Molecular Therapy.* 23, 5 (2015) 796–806.
77. SINGWI, S., JOSHI, S. - **Potential Nuclease-Based Strategies for HIV Gene Therapy.** *Frontiers in Bioscience.* 1, 5 (2000) 556–579.
78. THIEME. **Therapeutic Genome Editing with Engineered Nucleases** [Accessed march 20, 2019]. Available at: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.5482/HAMO-16-09-0035>
79. KIM, J.-S. - **Genome editing Comes of Age.** *Nature Protocols.* 11, 9 (2016) 1573–1578.
80. MENG, X., NOYES, M. B., ZHU, L. J., LAWSON, N. D., WOLFE, S. A. - **Targeted Gene Inactivation in Zebrafish using Engineered Zinc-Finger Nucleases.** *Nature Biotechnology.* 26 (2008) 695–70.
81. TOWNSEND, J. A., WRIGHT, D. A., WINFREY, R. J., FU, F., MAEDER, M. L., JOUNG, J. K., VOYTAS, D. F. - **High-Frequency Modification of Plant Genes using Engineered Zinc-Finger Nucleases.** *Nature.* 459, 7245 (2009) 442–445.
82. URNOV, F. D., MILLER, J. C., LEE Y. L., BEAUSEJOUR C. M., ROCK J. M., AUGUSTUS S., JAMIESON A. C., PORTEUS, M. H., GREGORY P. D., HOLMES, M. C. - **Highly Efficient Endogenous Human Gene Correction using Designed Zinc-Finger Nucleases.** *Nature.* 435 (2005) 646–651.
83. MILLER, J. C., HOLMES, M. C., WANG, J., GUSCHIN, D. Y., LEE, Y. L., RUPNIEWSKI, I., BEAUSEJOUR, C. M., WAITE, A. J., WANG, N. S., KIM, K. A., GREGORY, P. D., PABO, C. O., REBAR, E. J. - **An Improved Zinc-Finger Nuclease Architecture for Highly Specific Genome Editing.** *Nature Biotechnology.* 25 (2007) 778–785.
84. MOSCOU, M. J., BOGDANOVA, A. J. - **A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors.** *Science.* 326 (2009) 1501.
85. GAJ, T., GERSBACH, C. A., BARBAS, C. F. - **ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.** *Trends in Biotechnology.* 31, 7 (2013) 397–405.

86. LEUKAEMIA FOUNDATION. **Autologous Stem Cell Transplants** [Accessed march 25, 2019]. Available at: <https://www.leukaemia.org.au/disease-information/transplants/autologous-transplants/>
87. CANADIAN BLOOD SERVICES. **Therapeutic Apheresis** [Accessed march 25, 2019]. Available at: <https://professionaleducation.blood.ca/en/transfusion/guide-clinique/therapeutic-apheresis>
88. HOLT, N., WANG, J., KIM, K., FRIEDMAN, G., WANG, X., TAUPIN, V., CROOKS, G. M., KOHN, D. B., GREGORY, P. D., HOLMES, M. C., CANNON, P. M. - **Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Modified by Zinc-Finger Nucleases Targeted to CCR5 Control HIV-1 In Vivo**. *Nature Biotechnology*. 28 (2010) 839–47.
89. LI, L., KRYMSKAYA, L., WANG J., HENLEY, J., RAO, A., CAO, L. F., TRAN, C. A., TORRES-CORONADO, M., GARDNER, A., GONZALEZ, N., KIM, K., LIU, P. Q., HOFER, U., LOPEZ, E., GREGORY, P. D., LIU, Q., HOLMES, M. C., CANNON, P. M., ZAIA, J. A., DIGIUSTO, D. L. - **Genomic Editing of the HIV-1 Coreceptor CCR5 in Adult Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Using Zinc Finger Nucleases**. *Molecular Therapy*. 21, 6 (2013) 1259–1269.
90. UNIPROT. **Keyword - Zinc-Finger** [Accessed march 22, 2019]. Available at: <https://www.uniprot.org/keywords/KW-0863>
91. LIPPOW, S. M., AHA, P. M., PARKER, M. H., BLAKE, W. J., BAYNES, B. M., LIPOVŠEK, D. - **Creation of a Type IIS Restriction Endonuclease with a Long Recognition Sequence**. *Nucleic Acids Research*. 37, 9 (2009) 3061–3073.
92. HANDEL, E.-M., CATHOMEN, T. - **Zinc-Finger Nuclease Based Genome Surgery: Its All About Specificity**. *Current Gene Therapy*. 11, 1 (2011) 28–37.
93. CHENG, L.-T., SUN, L.-T., TADA, T. - **Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells**. *Genes to Cells*. 17, 6 (2012) 431–438.
94. URNOV, F. D., REBAR, E. J., HOLMES, M. C., ZHANG, H. S., GREGORY, P. D. - **Genome Editing with Engineered Zinc Finger Nucleases**. *Nature Reviews Genetics*. 11, 9 (2010) 636–646.
95. BOGDANOVA A. J., SCHORNACK S., LAHAYE T. - **TAL Effectors: Finding Plant Genes for Disease and Defense**. *Current Opinion in Plant Biology*. 13 (2010) 394–401.
96. WRIGHT, D. A., LI, T., YANG, B., SPALDING, M. H. - **TALEN-Mediated Genome Editing: Prospects and Perspectives**. *Biochemical Journal*. 462, 1 (2014) 15–24.

97. MUSSOLINO, C., CATHOMEN, T. - **TALE Nucleases: Tailored Genome Engineering Made Easy**. *Current Opinion in Biotechnology*. 23, 5 (2012) 644–650.
98. CERMAK, T, DOYLE, E.L., CHRISTIAN, M., WANG, L., ZHANG, Y., SCHMIDT, C., BALLER, J. A., SOMIA, N. V., BOGDANOVA, A. J., VOYTAS, D. F. - **Efficient Design and Assembly of Custom TALEN and other TAL Effector-Based Constructs for DNA Targeting**. *Nucleic Acids Research*. 39 (2011) e82.
99. GEIBLER, R., SCHOLZE H., HAHN, S., STREUBEL, J., BONAS, U., BEHRENS, SE., BOCH, J. - **Transcriptional Activators of Human Genes with Programmable DNA-Specificity**. *PLoS ONE*. 6 (2011) e19509.
100. THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. **Expanding the Genetic Editing Tool Kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9** [Accessed march 24, 2019]. Available at: <https://www.jci.org/articles/view/72992/figure/2>
101. DOYON, Y., VO, T. D., MENDEL, M. C., GREENBERG, S. G., WANG, J., XIA, D. F., MILLER, J. C., URNOV, F. D., GREGORY, P. D., HOLMES, M. C. - **Enhancing Zinc-Finger-Nuclease Activity with Improved Obligate Heterodimeric Architectures**. *Nature Methods*. 8, 1 (2010) 74–79.
102. BECKMAN COULTER – LIFE SCIENCES. **What Is the Difference between Non-Homologous End Joining (NHEJ) and Homology-Directed Repair (HDR)?** [Accessed march 24, 2019]. Available at: [https://www.beckman.fr/support/faq/research/non-homologous-end-joining-\(nhej\)-and-homology-directed-repair-\(hdr\)-difference](https://www.beckman.fr/support/faq/research/non-homologous-end-joining-(nhej)-and-homology-directed-repair-(hdr)-difference)
103. CAMBRIDGE DICTIONARY. **Specificity** [Accessed march 22, 2019]. Available at: <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/specificity>
104. CHANDRASEGARAN, S. - **Recent Advances in the Use of ZFN-Mediated Gene Editing for Human Gene Therapy**. *Cell and Gene Therapy Insights*. 3, 1 (2017) 33–41.
105. CATHOMEN, T., JOUNG J. K. - **Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges**. *Molecular Therapy*. 16, 7 (2008) 1200–1207.
106. CORNU, T. I., THIBODEAU-BEGANNY, S., GUHL, E., ALWIN, S., EICHTINGER, M., JOUNG, J., CATHOMEN, T. - **DNA-binding Specificity Is a Major Determinant of the Activity and Toxicity of Zinc-finger Nucleases**. *Molecular Therapy*. 16, 2 (2008) 352–358.
107. MUSSOLINO, C., CATHOMEN, T. - **On Target? Tracing Zinc-Finger Nuclease Specificity**. *Nature Methods*. 8 (2011) 725–726.

108. PATTANAYAK, V., RAMIREZ, C. L., JOUNG, J. K., LIU, D. R. - **Revealing Off-Target Cleavage Specificities of Zinc-Finger Nucleases by In Vitro Selection.** *Nature Methods.* 8 (2011) 765–770.
109. GUILINGER, J. P., PATTANAYAK, V., REYON, D., TSAI, S. Q., SANDER, J. D., JOUNG, J. K., LIU, D. R. - **Broad Specificity Profiling of TALENs Results in Engineered Nucleases With Improved DNA Cleavage Specificity.** *Nature Methods.* 11, 4 (2014) 429–435.
110. MUSSOLINO, C., ALZUBI, J., FINE, E. J., MORBITZER, R., CRADICK, T. J., LAHAYE, T., BAO, G., CATHOMEN, T. - **TALENs Facilitate Targeted Genome Editing in Human Cells with High Specificity and Low Cytotoxicity.** *Nucleic Acids Research.* 42, 10 (2014) 6762–6773.
111. LIN, Y., FINE, E. J., ZHENG, Z., ANTICO, C. J., VOIT, R. A., PORTEUS, M. H., CRADICK, T. J., BAO, G. - **A New Design Tool for Improving TALE Nuclease Activity.** *Nucleic Acids Research.* 42 (2014) e47.
112. JUILLERAT, A., PESSEREAU, C., DUBOIS, G., GUYOT, V., MARÉCHAL, A., VALTON, J., DABOUSSI, F., POIROT, L., DUCLERT, A., DUCHATEAU, P. - **Optimized Tuning of TALEN Specificity Using Non-Conventional RVDs.** *Scientific Reports.* 5, 1 (2015).
113. SMITH, J., BERG, J. M., CHANDRASEGARAN, S. - **A Detailed Study of the Substrate Specificity of a Chimeric Restriction Enzyme.** *Nucleic Acids Research.* 27, 2 (1999) 674–681.
114. SZCZEPEK, M., BRONDANI, V., BUCHEL, J., SERRANO, L., SEGAL, D. J., CATHOMEN, T. - **Structure-Based Redesign of the Dimerization Interface Reduces the Toxicity of Zinc-Finger Nucleases.** *Nature Biotechnology.* 25 (2007) 786–793.
115. WAH, D. A., BITINAITE, J., SCHILDKRAUT, I., AGGARWAL, A. K. - **Structure of FokI has Implications for DNA Cleavage.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 95, 18 (1998) 10564–10569.
116. HÄNDEL, E.-M., ALWIN, S., CATHOMEN, T. - **Expanding or Restricting the Target Site Repertoire of Zinc-finger Nucleases: The Inter-domain Linker as a Major Determinant of Target Site Selectivity.** *Molecular Therapy.* 17, 1 (2009) 104–111.

117. SHIM, G., KIM, D., PARK, G. T., JIN, H., SUH, S.-K., OH, Y.-K. - **Therapeutic Gene Editing: Delivery and Regulatory Perspectives.** *Acta Pharmacologica Sinica.* 38, 6 (2017) 738–753.
118. KAMIMURA, K., SUDA, T., ZHANG, G., LIU, D. - **Advances in Gene Delivery Systems.** *Pharmaceutical Medicine.* 25, 5 (2011) 293–306.
119. CHIRA, S., JACKSON, C. S., OPREA, I., OZTURK, F., PEPPER, M. S., DIACONU, I., BRAICU, C., RADULY, L.-Z., CALIN, G. A., BERINDAN-NEAGOE, I. - **Progresses Towards Safe and Efficient Gene Therapy Vectors.** *Oncotarget.* 6, 31 (2015).
120. COX, D. B. T., PLATT, R. J., ZHANG, F. - **Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges.** *Nature Medicine.* 21, 2 (2015) 121–131.
121. LOSKE, A. M., FERNÁNDEZ, F., GÓMEZ-LIM, M., RIVERA, A. L. - **Genetic Transformation of Cells using Physical Methods.** *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy.* 5, 4 (2014).
122. NAYEROSSADAT, N., ALI, P., MAEDEH, T. - **Viral and Nonviral Delivery Systems for Gene Delivery.** *Advanced Biomedical Research.* 1, 1 (2012) 27.
123. HO, B., LOH, S., CHAN, W., SOH, B. - **In Vivo Genome Editing as a Therapeutic Approach.** *International Journal of Molecular Sciences.* 19, 9 (2018) 2721.
124. KOTTERMAN, M. A., SCHAFFER, D. V. - **Engineering Adeno-Associated Viruses for Clinical Gene Therapy.** *Nature Reviews Genetics.* 15, 7 (2014) 445–451.
125. DAYA, S., BERNS, K. I. - **Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors.** *Clinical Microbiology Reviews.* 21, 4 (2008) 583–593.
126. GUHA, T. K., WAI, A., HAUSNER, G. - **Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering.** *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 15 (2017) 146–160.
127. JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J.A. and CHARPENTIER, E. - **A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.** *Science.* 337 (2012) 816–821.
128. LIN, C. - **Characterization and Optimization of the CRISPR/Cas System for Applications in Genome Engineering.** Harvard Library. (2014).
129. SOREK, R., KUNIN, V., HUGENHOTLZ, P. - **CRISPR - A Widespread System that Provides Acquired Resistance Against Phages in Bacteria and Archaea.** *Nature Reviews Microbiology.* 6, 3 (2008) 181–186.

130. BOLOTIN, A., QUINQUIS, B., SOROKIN, A., EHRLICH, S. D. - **Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) have Spacers of Extrachromosomal Origin.** *Microbiology*. 151 (2005) 2551–2561.
131. ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Bacteriophage.** [Accessed march 28, 2019]. Available at: <https://www.britannica.com/science/bacteriophage>
132. BARRANGOU, R., FREMAUX, C., DEVEAU, H., RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, D. A., HORVATH, P. - **CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes.** *Science*. 315, 5819 (2007) 1709–1712.
133. THE SCIENTIST. **There's CRISPR in Your Yogurt.** [Accessed march 29, 2019]. Available at: <https://www.the-scientist.com/notebook/theres-crispr-in-your-yogurt-36142>
134. HAO, M., CUI, Y., QU, X. - **Analysis of CRISPR-Cas System in *Streptococcus thermophilus* and Its Application.** *Frontiers in Microbiology*. 9 (2018).
135. DATSENKO, K. A., POUGACH, K., TIKHONOV, A., WANNER, B. L., SEVERINOV, K., SEMENOVA, E. - **Molecular Memory of Prior Infections Activates the CRISPR/Cas Adaptive Bacterial Immunity System.** *Nature Communications*. 3, 1 (2012).
136. JANSEN, R., EMBDEN, J. D., GAASTRA, W., SCHOOLS, L. M. - **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** *Molecular Microbiology*. 43, 6 (2002) 1565–75.
137. MALI, P., YANG, L., ESVELT, K. M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J. E., NORVILLE, J. E., CHURCH, G. M. - **RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.** *Science*. 339, 6121 (2013) 823–826.
138. ZHANG, F., WEN, Y., GUO, X. - **CRISPR/Cas9 for Genome Editing: Progress, Implications and Challenges.** *Human Molecular Genetics*. 23(R1) (2014) R40–R46.
139. XIAO, Q., GUO, D., CHEN, S. - **Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 9 (2019).
140. ALLEN, A., CHUNG, C.-H., ATKINS, A., DAMPIER, W., KHALILI, K., MICHAEL, R., NONNEMACHER, I., WIGDAHL, B. - **Gene Editing of HIV-1 Co-receptors to Prevent and/or Cure Virus Infection.** *Frontiers in Microbiology*. (2018).

141. CHYLINSKI, K., MAKAROVA, K. S., CHARPENTIER, E., KOONIN, E. V. - **Classification and Evolution of Type II CRISPR-Cas Systems.** *Nucleic Acids Research.* 42, 10 (2014) 6091–6105.
142. CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L. A., ZHANG, F. - **Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems.** *Science.* 339, 6121 (2013) 819–823.
143. LE RHUN, A., ESCALERA-MAURER, A., BRATOVIČ, M., CHARPENTIER, E. - **CRISPR-Cas in Streptococcus pyogenes.** *RNA Biology.* 1–10 (2019).
144. HU, X. - **CRISPR/Cas9 System and its Applications in Human Hematopoietic Cells.** *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 62 (2016) 6–12.
145. SWARTS, D. C., MOSTERD, C., VAN PASSEL, M. W. J., BROUNS, S. J. J. - **CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition.** *PLoS ONE.* 7, 4 (2012) e35888.
146. DAI, W.-J., ZHU, L.-Y., YAN, Z.-Y., XU, Y., WANG, Q.-L., LU, X.-J. - **CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids.* 5 (2016) e349.
147. LINO, C. A., HARPER, J. C., CARNEY, J. P., TIMLIN, J. A. - **Delivering CRISPR: a Review of the Challenges and Approaches.** *Drug Delivery.* 25, 1 (2018) 1234–1257.
148. LIN, C. - **Characterization and Optimization of the CRISPR/Cas System for Applications in Genome Engineering.** Doctoral dissertation, Office of Scholarly Communication at Harvard Medical School. (2014).
149. WU, X., KRIZ, A. J., SHARP, P. A. - **Target Specificity of the CRISPR-Cas9 System.** *Quantitative Biology.* 2, 2 (2014) 59–70.
150. MA, Y., ZHANG, L., HUANG, X. - **Genome Modification by CRISPR/Cas9.** *FEBS Journal.* 281, 23 (2014) 5186–5193.
151. SAAYMAN, S., ALI, S. A., MORRIS, K. V., WEINBERG, M. S. - **The Therapeutic Application of CRISPR/Cas9 Technologies for HIV.** *Expert Opinion on Biological Therapy.* 15, 6 (2015) 819–830.
152. LIU, C., ZHANG, L., LIU, H., CHENG, K. - **Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications.** *Journal of Controlled Release.* 266 (2017) 17–26.

153. OUDE BLENKE, E., EVERS, M. J. W., MASTROBATTISTA, E., VAN DER OOST, J. - **CRISPR-Cas9 Gene Editing: Delivery Aspects and Therapeutic Potential.** *Journal of Controlled Release.* 244 (2016) 139–148.
154. ELASWAD, A., KHALIL, K., CLINE, D., PAGE-MCCAW, P., CHEN, W., MICHEL, M., CONE, R., DUNHAM, R. - **Microinjection of CRISPR/Cas9 Protein into Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Embryos for Gene Editing.** *Journal of Visualized Experiments.* 131 (2018).
155. MEDIUM. **Fact Sheets about Microinjection—the Definition, Types, Advantages and Applications.** [Accessed april 7, 2019]. Available at: https://medium.com/@contact_28660/fact-sheets-about-microinjection-the-definition-types-advantages-and-applications-bc412acfa2b7
156. POTTER, H. - **Transfection by Electroporation.** *Current Protocols in Molecular Biology.* (2003).
157. WU, Z., YANG, H., COLOSI, P. - **Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging.** *Molecular Therapy.* 18, 1 (2010) 80–86.
158. RAN, F. A., CONG, L., YAN, W. X., SCOTT, D. A., GOOTENBERG, J. S., KRIZ, A. J., ZETSCHKE, B., SHALEM, O., WU, X., MAKAROVA, K. S., KOONIN, E. V., SHARP, P. A., ZHANG, F. - **In Vivo Genome Editing Using *Staphylococcus aureus* Cas9.** *Nature.* 520, 7546 (2015) 186–191.
159. XU, C., RUAN, M., MAHAJAN, V., TSANG, S. - **Viral Delivery Systems for CRISPR.** *Viruses.* 11, 1 (2019) 28.
160. ZHANG, Y., GE, X., YANG, F., ZHANG, L., ZHENG, J., TAN, X., JIN, Z. B., QU J., GU, F. - **Comparison of Non-Canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA Cleavage in Human Cells.** *Scientific Reports.* 4, 1 (2014).
161. ZHANG, X.-H., TEE, L. Y., WANG, X.-G., HUANG, Q.-S., YANG, S.-H. - **Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids.* 4 (2015) e264.
162. LABUHN, M., ADAMS, F. F., Ng, M., KNOESS, S., SCHAMBACH, A., CHARPENTIER, E. M., SCHWARZER, A., MATEO, J. L., KLUSMANN, J.-H., HECKL, D. - **Refined sgRNA Efficacy Prediction Improves Large- and Small-scale CRISPR–Cas9 Applications.** *Nucleic Acids Research.* 46, 3 (2017) 1375–1385.
163. GUILINGER, J. P., THOMPSON, D. B., LIU, D. R. - **Fusion of Catalytically Inactive Cas9 to FokI Nuclease Improves the Specificity of Genome Modification.** *Nature Biotechnology.* 32, 6 (2014) 577–582.

164. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV/AIDS** [Accessed april 20, 2019]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
165. VIROLOGY BLOG. **The London Patient** [Accessed april 20, 2019]. Available at: <http://www.virology.ws/2019/03/13/the-london-patient/>
166. CNN. **Two Men Might Be Second and Third to Be Cured of HIV** [Accessed april 20, 2019]. Available at: <https://edition.cnn.com/2019/03/04/health/hiv-remission-london-patient-study-bn/index.html>
167. EURONEWS. **Man in London Believed to Be Second to Be Cured of AIDS** [Accessed april 20, 2019]. Available at: <https://www.euronews.com/2019/03/05/man-in-london-believed-to-be-second-to-be-cured-of-aids>
168. MICROSOFT NEWS. **London HIV Patient Becomes World's Second AIDS Cure Hope** [Accessed april 20, 2019]. Available at: <https://www.msn.com/en-us/health/health-news/london-hiv-patient-becomes-worlds-second-aids-cure-hope/ar-BBUnjD7>
169. OPHINNI, Y., INOUE, M., KOTAKI, T., KAMEOKA, M. - **CRISPR/Cas9 System Targeting Regulatory Genes of HIV-1 Inhibits Viral Replication in Infected T-cell Cultures**. *Scientific Reports*. 8, 1 (2018).
170. QU, X., WANG, P., DING, D., LI, L., WANG, H., MA, L., ZHOU, X., LIU, S., LIN, S., WANG, X., ZHANG, G., LIU, S., LIU, L., WANG, J., ZHANG, F., LU, D., ZHU, H. - **Zinc-Finger-Nucleases Mediate Specific and Efficient Excision of HIV-1 Proviral DNA from Infected and Latently Infected Human T Cells**. *Nucleic Acids Research*. 41, 16 (2013) 7771–7782.
171. STRONG, C. L., GUERRA, H. P., MATHEW, K. R., ROY, N., SIMPSON, L. R., SCHILLER, M. R. - **Damaging the Integrated HIV Proviral DNA with TALENs**. *PLOS ONE*. 10, 5 (2015) e0125652.
172. WEEKS, D. P., SPALDING, M. H., YANG, B. - **Use of Designer Nucleases for Targeted Gene and Genome Editing in Plants**. *Plant Biotechnology Journal*. 14, 2 (2015) 483–495.

9. Annex I

Table I: Gene-Therapy Viral Vectors: Key features.

Viral Vector	Adeno-Associated Viral Vector	Adenoviral Vector	Lentiviral Vector
Family	<i>Parvoviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Retroviridae</i>
Genome	ssDNA	dsDNA	(+) ssRNA
Genome Size	≈ 5 kb	≈ 36 kb	≈ 10 kb
Virion diameter	≈ 22 nm	≈ 80 nm	≈ 100 nm
Packaging Capacity	≈ 4,5 kb	≈ 7,5 kb	≈ 8 kb
Tropism	Dividing and Non-dividing cells	Dividing and Non-dividing cells	Dividing and Non-dividing cells
Host Genome Interaction	Non-integrating*	Non-integrating	Integrating
Transgene Expression	Potential long lasting	Transient	Long lasting
Immunogenicity	Low	High	Low
Safety	High	Risk of systemic inflammatory response with systematic administration	Risk of insertional oncogenesis

*Adeno-associated viruses are able to precisely integrate with low frequency into chromosome 19.

10. Annex II

Table II: Systematic Comparison of the ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 genome-engineering platforms.

Designer Nuclease	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
DNA recognition	Zinc-Finger Proteins	TALE Proteins	sgRNA
Targeting Mechanism	Protein-DNA Interaction	Protein-DNA Interaction	RNA-DNA interaction via Watson-Crick base-pairing
DNA cleavage	Double-Strand Break induced by <i>FokI</i>	Double-Strand Break induced by <i>FokI</i>	Double-Strand Break induced by Cas9
Size	≈ 1 kb (x2)	≈ 3 kb (x2)	≈ 4,2 kb for SpCas9 + 0.1 kb for sgRNA
Sensitivity	One ZNF module recognizes triplicate nucleotides <u>Total:</u> 18-36 bp recognition site	One RVD recognizes a single nucleotide <u>Total:</u> 30-40 bp recognition site	One nucleotide recognizes a single nucleotide <u>Total:</u> ≈ 22 bp (20 bp guide sequence + 2 bp PAM)
Feasibility	Difficult Substantial protein engineering (months)	Moderate Molecular cloning methods (weeks)	Easy Simple 20 nt change, altering the crRNA sequence of sgRNA (days)
Specificity	Moderate Small number of mismatches tolerated (8)	High Small number of mismatches tolerated (5)	Low Multiple mismatches tolerated (higher off-target effects)
Ex vivo Delivery	Easy (Electroporation)	Easy (Electroporation)	Easy (Electroporation)
In vivo Delivery	Easy Small ZFN-size allows viral vectors transduction	Difficult Large size and repetitive nature of DNA encoding TALENs	Moderate Big SpCas9 may impose packaging problems with some viral vectors
Multiplexing	Challenging	Challenging	Highly Feasible
Efficiency	Moderate	Good	High