REVISTA TRANSDISCIPLINAR
UNIVERSO da Saúde
ISSN 2965-2340

EBT-101: A NOVA E PROMISSORA TERAPIA BASEADA EM CRISPR CONTRA HIV

Stephanie Nerval de Lima

Eduardo Mannarino Correia

Philippe Godefroy

Claudio Cesar Cirne-Santos

Emiliana Pereira Abraão

Afiliações e informações de autoria: 1 Graduanda em Farmácia – UNIVERSO Campus São Gonçalo/RJ 2 Orientador – Graduado em Ciências Biológicas – UFF Universidade Federal Fluminense 3 Professor do Curso de Farmadia da UNIVERSO Campus São Gonçalo/RJ 4 Médico, Colaborador da Disciplina de TCC da UNIVERSO Campus São Gonçalo/RJ

Resumo: O HIV foi isolado em 1983 e desde então é alvo de estudos para desvendar suas peculiaridades, já que é um vírus complexo além de possuir tipos, grupos, subtipos, CRFs e URFs, para desenvolvimento de drogas mais seguras, eficazes e efetivas e também para que um dia a cura dessa infecção tão devastadora seja alcançada. Em 2021 contávamos com 22 medicamentos registrados na ANVISA contra HIV, tais medicamentos são ofertados pelo SUS e geraram em 2021 um custo de R$ 1,65 Bilhões, já que foram a DCCI registrou 13.501 casos de HIV/AIDS até junho/2021. Como dito anteriormente os estudos direcionados à novos tratamentos são constantes e em 2012 novos caminhos foram abertos com a descoberta do sistema CRISPR pela microbiologista Emmanuelle Charpentier, PhD e a bioquímica Jennifer A. Doudna, PhD. Nesta revisão será apresentado um pouco sobre a história do HIV, sobre a descoberta do CRISPR/Cas e sobre a terapia com base na técnica CRISPR/Cas9 contra HIV chamada EBT-101 que em modelos animais se mostrou capaz de resultar em uma cura funcional, onde o pró-vírus não é extinguido da célula hospedeira, porém, perde sua capacidade de replicação sendo inativado de forma permanente, é importante pontuar que a extinção do pró-vírus foi alcançada em modelos animais. Os estudos do EBT-101 se iniciaram em 2014 e recentemente, em 2021 a empresa Excision (responsável por desenvolver o EBT-101) recebeu autorização da FDA para início dos testes FIH.
Palavras-chave: Terapia HIV; EBT-101; CRISPR/Cas9.

Abstract: HIV was isolated in 1983 and since then it has been the subject of studies to unravel its peculiarities, since it is a complex virus in addition to having types, groups, subtypes, CRFs and URFs, for the development of safer, more effective and effective drugs and also for that one day a cure for this devastating infection will be achieved. In 2021, we had 22 medicines registered with ANVISA against HIV, these medicines are offered by the SUS and in 2021 generated a cost of R$ 1.65 billion, since the DCCI recorded 13,501 cases of HIV/AIDS until June/2021. As previously mentioned, studies aimed at new treatments are constant and in 2012 new paths were opened with the discovery of the CRISPR system by microbiologist Emmanuelle Charpentier, PhD and biochemist Jennifer A. Doudna, PhD. In this review, we will present a little about the history of HIV, about the discovery of CRISPR/Cas and about the therapy based on the CRISPR/Cas9 technique against HIV called EBT-101, which in animal models has been shown to be able to result in a functional cure, where the pro-virus is not extinguished from the host cell, however, it loses its replication capacity being permanently inactivated, it is important to point out that the pro-virus extinction was achieved in animal models. EBT-101 studies began in 2014 and recently, in 2021, the company Excision (responsible for developing EBT-101) received FDA authorization to start FIH tests.
Keywords: HIV Therapy; EBT-101; CRISPR/Cas9.

INTRODUÇÃO

Em 1981 foram registrados os primeiros casos da doença AIDS, e as informações conhecidas na época, eram que o público afetado consistia em homens gays e que era uma patologia transmitida sexualmente e por sangue contaminado. O cientista Francês Luc Montagnier e o americano Robert Gallo estudavam com afinco o causador da patologia em questão e descobriram que se tratava de um retrovírus e chegaram a trocar amostras de estudo. E finalmente no dia 20 de maio de 1983 no Instituto Pasteur, na França, o cientista Luc Montagnier obteve sucesso em isolar o HIV (AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DA AIDS, 2019). Após sua descoberta os estudos foram direcionados para como esse vírus se comportava no corpo humano, quais suas ações depois de instalado e como seria possível controlar a evolução da patologia.

Dados retirados do site da SINAN mostram que entre 1980-2008 a DCCI registrou 553.225 casos de HIV/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a). Isso nos mostra o qual necessário era a sintetização de um medicamento que pelo menos conseguisse controlar a infecção pelo HIV que na década de 80 aumentava grandemente, pela negligência e preconceito das pessoas. E nessa busca por um medicamento que pudesse controlar a infecção, em 1987, 4 anos após o isolamento do HIV, o laboratório GlaxoSmithKline lança o primeiro antirretroviral, a Zidovudina (Retrovir®) (ALVES, 2011). Desde 1996, o Brasil distribui gratuitamente os ARV a todas as pessoas vivendo com HIV que necessitam de tratamento. Em 2021 existiam 22 medicamentos, em 38 apresentações farmacêuticas voltados para pacientes com HIV/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). O tratamento para HIV é ofertado pelo SUS e tal tratamento vêm sendo otimizado para melhor adesão e resultados perante os pacientes, no dia 30/11/2021 o site do governo do Brasil publicou a aprovação de um novo tratamento que consiste na utilização de 1 dose diária de um comprimido composto por 2 substâncias antes não associadas, sendo elas, a Lamivudina + Dolutegravir Sódico. O uso dessa associação resulta em uma redução da carga viral e estabiliza a mesma em níveis baixos, além de promover um aumento na contagem das células T CD4+, esse medicamento foi ofertado pelo laboratório GlaxoSmithKline (ANVISA, 2011). Dados mais atuais retirados do site da SINAN mostram que até junho/2021 a DCCI registrou 13.501 casos de HIV/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a). As Figuras (Figs 1 e 2) dispostas em anexo, apresentam um custo de R$ 1,65 Bilhões no ano de 2021 para a aplicação direta na ação de atendimento à população para prevenção, controle e tratamento de HIV/AIDS, outras infecções sexualmente transmissíveis e hepatites virais (o valor se refere à plano nacional, não sendo especificado os valores estaduais, nem os valores de cada medicação ofertada) (GOVERNO FEDERAL, 2011).

E nessa busca para encontrar tratamentos mais eficazes contra HIV, a Excision BioTherapeutics, Inc., que é uma empresa de biotecnologia que desenvolve terapias baseadas em CRISPR destinadas a curar doenças infecciosas virais, está focada em melhorar a vida de pacientes com doenças crônicas extirpando genomas virais de indivíduos infectados. Ao usar o CRISPR de maneira única, a empresa demonstrou a capacidade de induzir uma cura funcional, que é caracterizada pela remissão do vírus sem que o mesmo desapareça do organismo, em animais. E nos estudos pré-clínicos ele foi capaz de extirpar o DNA pró-viral em células primárias humanas e in vivo. (GLOBE NEWSWIRE, 2021)

A empresa anunciou no dia 15 de setembro de 2021, que a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aceitou o pedido do novo medicamento EBT-101 para candidato terapêutico baseado em CRISPR desenvolvido como uma potencial cura funcional para o HIV crônico. A liberação do IND permite que a empresa inicie o primeiro ensaio clínico 1 e 2 em humanos para avaliar sua segurança, tolerabilidade e eficácia em indivíduos portadores de HIV tipo 1 (GLOBE NEWSWIRE, 2021), já que este é o mais prevalente.

[...]Geograficamente, enquanto o HIV-1 ocorre em todo o mundo, o HIV-2 é restrito principalmente à África Ocidental e comunidades na Europa com ligações socioeconômicas com a África Ocidental [...]

(NYAMWEYA, et al, 2013, p. 221, tradução nossa)

Porém é importante ressaltar que o HIV possui uma diversidade muito ampla.

O HIV-1 possui 4 grupos distintos, sendo eles: Grupo M (Major); Grupo O (Outlier); Grupo N (non-M, non-O) e recentemente o grupo P, sendo o Grupo M subdividido em 9 subtipos, sendo eles: A-D, F-H, J, K. O HIV-2 possui 9 grupos, referenciados anteriormente como subtipos A a I (poucos subtipos foram descritos). Há também a forma recombinante circulante ou forma recombinante circulante (CRF), que é uma combinação de genomas virais de diferentes subtipos em pessoas duplamente infectadas, até 2019 haviam 98 CRFs registrados no banco de dados de sequências de HIV do Laboratório Nacional de Los Alamos. E por fim temos as formas recombinantes únicas (URFs) que consistem em uma mistura de subtipos, porém, são provenientes de um único indivíduo multi-infectado. (BBOSA; KALEEBU; SSEMWANGA, 2019, tradução nossa).

METODOLOGIA

Nesta pesquisa bibliográfica, foram selecionados documentos das seguintes bases de dados: agenciaaids.com.br, www.arca.fiocruz.br, www.gov.br, www.portaltransparencia.gov.br, www.globenewswire.com, indicadores.aids.gov.br, www.aids.gov.br, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov, www.far.fiocruz.br, www.pfizer.com.br, clinicaltrials.gov, www.broadinstitute.org, www.science.org, www.nature.com e www.nejm.org. Foram utilizadas as seguintes palavras – chaves: HIV, CRISPR e EBT-101. Os resultados das pesquisas foram apresentados de forma descritiva; A abordagem foi apresentada de forma qualitativa; Usando como técnica a Revisão Bibliográfica; Com o objetivo de evidenciar a terapia genética EBT-101, a forma como o HIV se instala no organismo assim como as consequências dessa infecção, foram revisadas, em seguida a técnica CRISPR/CAS foi caracterizada e a terapia EBT-101 foi apresentada. A presente revisão foi apresentada como TCC para graduação em Farmácia e a elaboração do mesmo seguiu da seguinte forma: Seleção de Tema (Fevereiro/2022); Revisão Bibliográfica (Fevereiro – Maio/2022 e Agosto – Setembro2022); Elaboração do projeto e relação do corpo do trabalho (Março – Maio/2022. Agosto – Setembro/2022); Entrega Final (Setembro/2022).

DISCUSSÃO

HIV

O HIV é um retrovírus da família Lentivírus e como todos os membros desse gênero apresenta genomas complexos e partículas de núcleo de capsídeo em forma de cone. Seu genoma é codificado pelo RNA, e este é transcrito de forma reversa para o DNA viral ao entrar em contato com a célula hospedeira. (TURNER; SUMMERS, 1999)

A infecção pode ocorrer por diversas formas, sendo algumas:

 Contato sexual vaginal, anal e/ou oral sem uso de preservativos; Transfusão de sangue contaminado; Compartilhamento de seringas; Ferimento por objetos perfuro-cortantes não estéreis; Transmissão de mãe portadora para feto durante a gravidez, no parto e/ou através da amamentação. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021c)

Ao entrar na circulação sanguínea do indivíduo infectado, o vírus reconhece os linfócitos T CD4+3 e se conecta à ela; Ocorre a fusão do vírus com a célula hospedeira onde, através da transcriptase reversa, há a transcrição reversa do RNA viral para o DNA viral; O DNA viral (próvirus) é transportado para o núcleo do linfócito ou das células de reservatório, e após instalado, ele altera o DNA da célula hospedeira para que a mesma sintetize cópias do HIV; Após essa multiplicação, os novos vírus

3 Os linfócitos T CD4+ são importante no mecanismo imune pois além de participar da identificação,

ataque e destruição de antígenos, também possuem como função recrutar e ativar células fagocitárias e auxiliar na produção de anticorpos, junto aos linfócitos B. destroem o linfócito ao rompê – lo para que sejam liberados para a corrente sanguínea podendo assim infectar outros linfócitos T CD4+ e células de reservatório, dando sequência a sua multiplicação (TURNER; SUMMERS, 1999). Conforme o HIV se multiplica e destrói os linfócitos T CD4+, o sistema imunológico fica deficiente, já que as T CD4+ são um dos responsáveis pela defesa inata do organismo contra agentes infecciosos, e a queda das células T CD4+ abre oportunidade para o desenvolvimento de outras doenças, que são chamadas de oportunistas, e quando isso ocorre o indivíduo deixa de ser apenas portador do HIV e passa a ter AIDS. (PFIZER, 2022)

TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA O HIV

Em 2021 existiam 22 medicamentos, em 38 apresentações farmacêuticas voltados para pacientes com HIV/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a). Um desses medicamentos é o complexo Lamivudina + Zidovudina que segundo o site Farmanguinhos é classificado como um ITRN e age reduzindo a carga viral no organismo, mantendo os níveis baixos e aumentando a contagem de células T CD4+. (FIOCRUZ, 2020)

Tal medicamento foi um avanço para nossa ciência, porém ainda vislumbramos a cura do HIV e com esse desejo, cientistas resolveram tentar um novo tratamento a base de CRISPR/Cas9, tratamento este que promete, inicialmente, uma cura funcional do HIV. Porém, antes de falarmos sobre o tratamento em si, vamos conhecer um pouco mais sobre o sistema CRISPR – CAS9.

CRISPR/CAS

A Microbiologista Emmanuelle Charpentier, PhD e a bioquímica Jennifer A. Doudna, PhD4 em conjunto com colegas definem o sistema CRISPR da seguinte forma: em conjunto com colegas definem o sistema CRISPR da seguinte forma:

Bacteria e archaea evoluíram sistemas de defesa adaptativos mediados por RNA chamados de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas (CRISPR)/CRISPR

4 Ganhadoras do prêmio Nobel de Química de 2020 pela descoberta da ferramenta de edição de

genes CRISPR em 2012 associadas a (Cas) que protegem os organismos de vírus e plasmídeos invasores. (1-3). Esses sistemas de defesa dependem de pequenos RNAs para detecção específica de sequência e silenciamento de ácidos nucleicos estranhos. Os sistemas CRISPR/Cas são compostos por cas genes organizados em operon(s) e array(s) CRISPR que consistem em sequências de direcionamento do genoma (chamadas espaçadores) intercaladas com repetições idênticas (1-3). A imunidade mediada por CRISPR/Cas ocorre em três etapas. Na fase adaptativa, as bactérias e archaea que abrigam um ou mais loci CRISPR respondem ao desafio viral ou plasmidial integrando fragmentos curtos de sequência estranha (protoespaçadores) no cromossomo hospedeiro na extremidade proximal do array CRISPR. (1-3). Nas fases de expressão e interferência, a transcrição do elemento repetidor espaçador em moléculas precursoras de RNA CRISPR (pré-crRNA) seguida de clivagem produz os crRNAs curtos que podem emparelhar com sequências protoespaçadoras complementares de alvos virais ou plasmidiais invasores. (4-11). O reconhecimento do alvo por crRNAs direciona o silenciamento das sequências estranhas por meio de proteínas Cas que funcionam em complexo com os crRNAs (10, 12-20).

(JINEK at al., 2012, p 816, tradução nossa) E Segundo Lander (2016, p 18, tradução nossa):

[...] Apenas 3 anos atrás, os cientistas relataram que o sistema CRISPR – um sistema imunológico adaptativo usado por micróbios para se defender contra vírus invasores gravando e direcionando suas sequências de DNA – poderia ser reaproveitado em uma técnica simples e confiável para editar, em células vivas, o genomas de mamíferos e outros organismos. O CRISPR logo foi adaptado para uma vasta gama de aplicações – criando modelos animais complexos de doenças e cânceres herdados por humanos; realizar rastreios de todo o genoma em células humanas para identificar os genes subjacentes aos processos biológicos; ligar ou desligar genes específicos; e plantas geneticamente modificadoras — e está sendo usado em milhares de laboratórios em todo o mundo [...]. Resumidamente eles viram no sistema CRISPR a possibilidade de modificar genomas para criar sistemas mais resistentes, seja a infecções ou a manifestações clínicas de patologias, assim como viram a possibilidade de curar certas patologias. Por exemplo, Frangoul et al. (2020) nos traz um estudo clínico muito interessante, onde ele juntamente com uma equipe, reuniu 2 pacientes (1 portadora de β-talassemia e 1 portadora de Doença Falciforme) que na tentativa de aumentar a hemoglobina fetal (HbF) (que quando em altas concentrações permite que o paciente fique assintomático e que naturalmente é reduzida após o nascimento por causa do aumento da β-globina e da hemoglobina adulta (HbA)), se aplicou a técnica CRISPR/Cas9 em células tronco hematopoiéticas com o intuito de reduzir

a expressão de BCL11A (Fator de transcrição responsável pela repressão de expressão de HbF) em células eritróides e restaurar a síntese de γ-globina para assim reativar a produção de hemoglobina fetal (essa escolha é devido ao fato da HbF ter uma afinidade maior com oxigênio em relação à HbA). Resumidamente, com essa manipulação ambos os pacientes obtiveram um aumento significativo e sustentável de hemoglobina fetal e a eliminação de casos de vaso-oclusão para a paciente com doença falciforme e a falta de necessidade de transfusão para a paciente com β-talassemia, tais resultados geraram um aumento de sobrevida nos eritrócitos.

Segundo Makarova et al (2020, p 67, tradução nossa):

[...] CRISPR-Cas sistemas, que são mais conhecidos como componentes chave de uma nova geração de ferramentas de engenharia genômica1,2, funcionam naturalmente como mecanismos de imunidade adaptativa em bactérias e archaea. A resposta imune CRISPR – Cas consiste em três etapas principais: adaptação, expressão e interferência. No estágio de adaptação, um complexo distinto de proteínas Cas se liga a um DNA alvo, muitas vezes após reconhecer um DNA distinto e curto. Motivo conhecido como motivo adjacente ao protoespaçador (PAM) e cliva uma parte do DNA alvo, o protoespaçador. Após a duplicação da repetição na extremidade 5' do Matriz CRISPR, o complexo de adaptação insere o DNA protoespaçador no arranjo, de modo que ele se torna um espaçador. Alguns sistemas CRISPR – Cas empregam um mecanismo alternativo de adaptação - a saber, a aquisição de espaçador do RNA, via transcrição reversa por uma transcriptase reversa codificada no CRISPR–cas locus. Na fase de expressão, a matriz CRISPR é normalmente transcrita como um único transcrito - o RNA pré-CRISPR (pré-crRNA) - que é processado em maduro RNAs CRISPR (crRNAs), cada um contendo a sequência espaçadora e partes das repetições de flanqueamento. Em diferentes variantes de CRISPR – Cas, o processamento de pré-crRNA é mediado por uma subunidade distinta de um complexo multiproteico Cas, por uma única proteína Cas multidomínio ou por RNases hospedeiras não-Cas. No estágio de interferência, o crRNA, que normalmente permanece ligado ao complexo de processamento (proteína), serve como guia para reconhecer o protoespaçador (ou uma sequência muito semelhante) no genoma invasor de um vírus ou plasmídeo, que é então clivado e inativado por uma nuclease Cas (ou nucleases) que faz parte do efetor ou é recrutada no estágio de interferência. O resumo acima é uma breve e simplificada descrição da funcionalidade CRISPR – Cas que inevitavelmente omite muitos detalhes[...]. Resumidamente, o CRISPR é um sistema de edição e manipulação gênica, que possibilita modificar, excluir e/ou acrescentar5 elementos na fita de DNA e isso possibilita ativar ou inativar a tradução de proteínas que por consequência, pode por exemplo criar um organismo capaz de resistir à certas infecções ou até mesmo curar certas patologias de origem genética.

O Broad Institute (Centro de pesquisa biomédica e genômica localizado em Cambridge, Massachusetts, EUA), nos traz uma timeline muito interessante que parte da descoberta do CRISPR como sistema imune adaptativo, até a sua utilização como ferramenta de manipulação gênica:

Tabela 1 – Timeline CRISPR/Cas

1993 - 2005	Francisco Mojica descobre uma sequência palindrômica repetitiva, que mais tarde será chamada de CRISPR e terá sua função determinada como um sistema imunológico adaptativo pertencente à bacteriófagos;
Maio, 2005	Alexander Bolotin estudando a Streptococcus thermophilus encontra um locus CRISPR incomum o que o leva à descobrir o Cas9, proteína de RNA nuclease codificante e o PAM que é necessário para o reconhecimento do alvo no DNA;
Março, 2006	Eugene Koonin estuda um esquema hipotético de imunidade adaptativa, onde o sistema CRISPR funciona baseado em inserções homólogas de DNA;
Março, 2007	Philippe Horvath juntamente com colegas demonstram a atividade imune adaptativa do CRISPR em uma amostra de laticínio, ao integrar um novo DNA de fago eles conseguiram combater novos fagos atacantes. Além disso provaram que a Cas9 era a única proteína necessária para que o CRISPR inativasse o fago invasor;
Agosto, 2008	John Van Der Oost descobre que sequências espaçadoras derivadas de fagos são transcritas em fragmentos de RNA e estes guiam as Cas para o DNA alvo e é dessa forma que o CRISPR intervinha nos fagos invasores;
Dezembro, 2008	Luciano Marraffini e Erik Sontheimer demonstraram que o alvo do CRISPR não era o RNA e sim o DNA;
Dezembro, 2010	Sylvain Moineau e colegas demonstram que o CRISPR-Cas9 cria quebras na dupla fita de DNA em posições precisas em 3 nucleotídeos do PAM, além disso reafirmaram que a Cas9 era a única proteína necessária para esta clivagem;

5 Para acrescentar elementos na fita de DNA, a técnica CRISPR precisa estar associada ou a outras

técnicas, como de DNA doador ou se for uma variante da aplicação original, como Prime Editor, o qual faz uma transcrição reversa local, por meio de Transcriptase Reversa ligada a Cas9. Nessa técnica o gRNA é diferente, apresentando uma porção que é a fita molde para a transcrição reversa. (ALZALONE et all., 2019)

Março, 2011	Emmanuelle Charpentier descobre um último detalhe do mecanismo de ação do CRISPR, o tracrRNA, que juntamente com o crRNA guia o Cas9 para o DNA alvo;
Julho, 2011	Virginijus Siksnys e colegas clonaram o CRISPR de S. thermophilus e expressaram em E. coli e com isso demonstraram que o sistema podia funcionar de forma heteróloga em outras espécies;
Junho, 2012	Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna relataram que o crRNA e o tracrRNA poderiam ser fundidos criando assim um sistema única de guia;
Setembro, 2012	Virginijus Siksnys e colegas aproveitaram o seu sistema heterólogo e realizaram alguns experimentos para caracterizar bioquimicamente a ação da Cas9, também verificaram o sítio de clivagem, notaram que o domínio RuvC cliva a fita não complementar e o HNH o sítio complementar. Além disso eles demonstraram que poderiam reprogramar a Cas9 para um local de sua escolha no DNA alterando uma sequência específica do crRNA;
Janeiro, 2013	Feng Zhang e sua equipe demonstram que o CRISPR-Cas9 pode ser utilizado para clivar genomas em células humanas e em camundongos, podendo assim conduzir reparos por homologia.

(BROAD INSTITUTE, 2022)

EBT-101

Com esse pensamento, surgiu o estudo sobre o EBT-101, que segundo EXCISION BIOTHERAPEUTICS (2022) é um sistema de edição de genes de repetições palindrômicas curtas (CRISPR)/Cas9 agrupados regularmente específicos para HIV-1, entregues por vetor do vetor viral associado a adenovírus sorotipo 9 (AAV9) (adenovírus geneticamente modificado) para administração intravenosa (IV)

Os estudos estão sendo realizados em 3 locais nos EUA: Califórnia (ainda não recrutando), Missouri e Nova Jersey, ambas recrutando

(EXCISION

BIOTHERAPEUTICS, 2022)

Será um estudo First in Human (FIH), onde 9 participantes receberão uma dose única ascendente (SAD) de EBT-101 administrada de forma IV. Abaixo segue os critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos participantes:

Tabela 2 – Critérios de Inclusão para seleção dos participantes do estudo FIH

EBT-101

Critérios de

Disposto a se inscrever e assinar o consentimento informado por

Inclusão

escrito para EBT-101-001 (estudo atual) e EBT-101-002, o estudo (abreviado)

LTFU

	Idade entre 18 e 60 anos (ambos inclusive).
	Peso corporal ≥45 e ≤90 kg.
	A Coorte A inscreverá apenas indivíduos do sexo masculino (sexo ao nascer).[6]
	Infecção crônica por HIV-1 documentada com os seguintes critérios de status de manejo: em um regime estável definido como tratamento contínuo de TARV por > 2 anos antes da triagem; sem interrupções nos últimos 12 meses superiores a 14 dias consecutivos; nenhuma alteração no regime ou doses por >90 dias antes da data de dosagem planejada; regime será mantido durante toda a duração do estudo.
	Níveis plasmáticos de RNA HIV-1 abaixo do limite de quantificação: em todos os resultados disponíveis nos últimos 12 meses (valores isolados ≥20 mas <200 cópias/mL serão permitidos se forem precedidos e seguidos por resultados de carga viral indetectável); dentro de 60 dias antes da data de dosagem planejada; contagem de células T CD4 no sangue periférico >500 células/mm3 nos 60 dias anteriores à data de dosagem planejada.
	Valores laboratoriais normais em sistemas hematológicos, hepáticos, renais e outros para triagem de segurança laboratorial.
	Disposto e capaz de cumprir, conforme avaliado pelo Investigador, todos os procedimentos relacionados ao estudo.
	Foram previamente vacinados contra N. meningitidis[7] com histórico documentado e/ou receberam uma vacinação contra N. meningitidis antes da dosagem.
	Disposto a interromper o ART se elegível para interrupção do tratamento analítico.
	Dispostos a cumprir as medidas de prevenção da transmissão e reinfecção do HIV exigidas pelo protocolo.
	Deve ter recebido uma vacina COVID-19, com a última dose ≥30 dias antes da dosagem.

(EXCISION BIOTHERAPEUTICS, 2022) Tabela 3 – Critérios de Exclusão para seleção dos participantes do estudo FIH

EBT-101

Critérios de Exclusão (abreviado)	Resistência prévia documentada a medicamentos do HIV-1 a ≥2 ou mais classes de ART definidas como mutações chave únicas ou um acúmulo de mutações menores que resultam em resistência a todas as respectivas classes de medicamentos nos últimos 5 anos.
	História de >1 alteração no ART devido a falha virológica durante os 2 anos anteriores.
	Receber ou ter planos para iniciar TARV injetável de longa duração.
	Grávida ou amamentando ou planejando engravidar (própria ou parceira) ou amamentar a qualquer momento até 48 semanas após a dose.
	História de demência por HIV.

6 (XY)

7 Neisseria meningitidis é um diplococo Gram-negativo, aeróbico, que é transmitido por contato com

muco ou gotículas respiratórias, geralmente de portadores assintomáticos

	História de leucoencefalopatia multifocal progressiva.
	História de evento cardiovascular conhecido no último ano ou história de doença cardíaca relacionada ao HIV.
	História de doença renal relacionada ao HIV com função renal anormal.
	História de uma ou mais infecções oportunistas relacionadas ao HIV ou nos últimos 2 anos.
	Evidência de hepatite B aguda ou crônica (antígeno de superfície sérico positivo da hepatite B [HBsAg], anticorpo sérico positivo do núcleo da hepatite B [anti-HBcAb]) e/ou hepatite C (HCV-RNA detectável no plasma).
	História conhecida ou diagnóstico de cirrose hepática, fígado gorduroso não alcoólico ou esteatohepatite não alcoólica avançada.
	História conhecida de teste tuberculínico positivo.
	Recebimento de qualquer vacina experimental contra o HIV (profilática e/ou terapêutica) no ano anterior à triagem.
	Recebimento de qualquer produto de terapia gênica aprovado ou experimental, a qualquer momento.
	Anticorpos neutralizantes de soro anti-AAV9 (Nabs) > 1:20 título.
	Teste positivo conhecido para SARS-CoV-2 nos 30 dias anteriores à triagem e/ou sintomas persistentes (longos) relacionados à COVID-19 durante a triagem.

(EXCISION BIOTHERAPEUTICS, 2022) Estes são os critérios (abreviados) contidos no site: clinicaltrials.gov (Banco de dados onde se registra ensaios clínicos. É administrado pela National Library of Medicine), ainda não é de conhecimento público reações adversas do uso do EBT- 101, porém os participantes dos ensaios terão um acompanhamento detalhado durante os 15 anos posteriores aos testes.

A Excision disponibiliza em seu site artigos de estudos com o uso do CRISPR para tratamento do HIV e outras patologias, segue a lista dos mesmos:

Tabela 4 – Artigos disponibilizados pela empresa Excision de estudos com o uso de CRISPR.

Data	**Título Original**	**Tradução nossa**
		A edição de genes dirigida por RNA-directed gene editing RNA erradica especificamente a

Agosto 2014

specifically eradicates latent and infecção latente e previne novas prevents new HIV-1 infection infecções por HIV-1

Junho 2015	Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS	Estratégias de edição de genoma: ferramentas potenciais para erradicar o HIV-1/AIDS
Setembro 2015	CRISPR/Cas9 System as an Agent for Eliminating Polyomavirus JC Infection	Sistema CRISPR/Cas9 como agente para eliminar a infecção por poliomavírus JC
Dezembro 2015	Animal Models for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy	Modelos animais para leucoencefalopatia multifocal progressiva
Março 2016	Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing	Eliminação de genomas de HIV-1 de células linfóides T humanas por edição de genes CRISPR/Cas9
Abril 2016	Inhibition of HSV-1 Replication by Gene Editing Strategy	Inibição da replicação de HSV-1 por estratégia de edição de genes
Agosto 2016	Negative Feedback Regulation of HIV-1 by Gene Editing Strategy	Regulação de feedback negativo do HIV-1 por estratégia de edição genética
Agosto 2016	Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study	Excisão do DNA do HIV-1 por edição genética: um estudo in vivo de prova de conceito
Dezembro 2016	Gene Editing Approaches against Viral Infections and Strategy to Prevent Occurrence of Viral Escape	Abordagens de edição genética contra infecções virais e estratégia para prevenir a ocorrência de escape viral
Maio 2017	In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models	Excisão in vivo do provírus HIV-1 por saCas9 e RNAs de guia único multiplex em modelos animais

Julho 2017	Novel AIDS therapies based on gene editing	Novas terapias contra a AIDS baseadas na edição de genes
Novembro 2017	CRISPR Editing Technology in Biological and Biomedical Investigation	Tecnologia de edição CRISPR em investigação biológica e biomédica
Abril 2018	CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity	A ligação ao alvo CRISPR-Cas12a desencadeia atividade indiscriminada de DNase de fita simples
Junho 2018	Removal of HIV DNA by CRISPR from Patient Blood Engrafts in Humanized Mice	Remoção de DNA de HIV por CRISPR de enxertos de sangue de pacientes em camundongos humanizados
Novembro 2016	Broad-Spectrum and Personalized Guide RNAs for CRISPR/Cas9 HIV-1 Therapeutics	RNAs guia personalizados e de amplo espectro para terapias de HIV-1 CRISPR/Cas9
Dezembro 2018	Toward the Cure of HIV-1 Infection: Lessons Learned and Yet to be Learned as New Strategies are Developed	Rumo à cura da infecção por HIV-1: lições aprendidas e ainda a serem aprendidas à medida que novas estratégias são desenvolvidas
Dezembro 2018	Gene Editing of HIV-1 Co-receptors to Prevent and/or Cure Virus Infection	Edição de genes de co-receptores de HIV-1 para prevenir e/ou curar infecção por vírus
Março 2019	Magnetically guided non-invasive CRISPR-Cas9/gRNA delivery across blood-brain barrier to eradicate latent HIV-1 infection	Entrega não invasiva de CRISPR-Cas9/gRNA guiada magneticamente através da barreira hematoencefálica para erradicar a infecção latente pelo HIV-1
Julho 2019	Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice	Tratamentos sequenciais LASER ART e CRISPR eliminam HIV-1 em um subconjunto de camundongos humanizados infectados

Agosto 2020	A scoutRNA Is Required for Some Type V CRISPR-Cas Systems	Um scoutRNA é necessário para alguns sistemas CRISPR-Cas Tipo V
Novembro 2020	CRISPR based editing of SIV proviral DNA in ART treated non-human primates	Edição baseada em CRISPR de DNA proviral de SIV em primatas não humanos tratados com ART
* Todos os artigos citados se encontram no banco de informações do site da Excision (https://www.excision.bio/publications), para leitura das publicações de forma integral, o site direciona para os devidos locais de publicação, sendo eles: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov; https://www.nature.com; https://journals.plos.org; cell.com e https://www.frontiersin.org		

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como intuito, através de pesquisas bibliográficas, apresentar a EBT-101, uma Terapia que utiliza o sistema CRISPR/CAS9 para tratamento do HIV/AIDS afim de trazer o assunto ao conhecimento tanto de acadêmicos, quanto de profissionais da saúde e também de pessoas não envolvidas em nenhum dos dois mundos

Ao longo do trabalho os seguintes pontos foram tratados:

- Breve história do isolamento do HIV;

- Medicamentos ofertados pelo Governo Brasileiro para o tratamento do HIV;

- Maneiras de contaminação, instalação e multiplicação do HIV/AIDS;

- Breve caracterização do sistema CRISPR/CAS e suas aplicações;

- Exposição da nova terapia EBT-101 desenvolvida pela empresa Excision para tratamento do HIV.

Temos que ter em mente que as drogas hoje utilizadas para tratamento do HIV controlam a replicação, mantendo-a em um nível mínimo, porém, não são capazes de extinguir o pró-vírus da célula hospedeira e ao interromper o tratamento, a replicação é retomada. A proposta do EBT é inativar o vírus de forma permanente, assim sendo, o paciente faria a terapia somente por um determinado tempo e após o término desse período o pró-vírus não seria mais capaz de se reproduzir, é o que chamam de cura funcional, já que não há extinção do pró-vírus inicialmente, porém esta extinção foi alcançada em modelos primatas e está sendo estudada para alcance em humanos também.

É importante ressaltar que o uso da técnica CRISPR/CAS para terapias, é relativamente novo, portanto, ainda há muitas informações não conhecidas, porém os estudos nesse campo genético estão se expandindo e ganhando mais força na comunidade científica, já que a manipulação de genoma nos dá um vislumbre de poder prever falhas, ajustar genomas disfuncionais e manipular genomas patológicos para que a expressão dos mesmos seja minimizada ou até mesmo que não haja tal expressão.

A Excision já divulgou o início dos testes com EBT-101 em humanos e para obter mais informações à respeito desses e dos demais estudos que estão sendo desenvolvidos pela empresa, recomendo que visite o site da empresa: https://www.excision.bio/

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço à Deus, pois sem ele eu não seria nada, tudo que tenho e tudo que sou vêm dEle.

Agradeço também à minha família, meu pai Edson, minha mãe Salomé, meu irmão Virgilio, minha sobrinha Brianna e minha cunhada Joice, pois aguentaram cada momento de tensão e estresse, sempre me incentivando a nunca desistir, eu amo vocês!

Agradeço à todas as pessoas que contribuíram para a minha formação acadêmica e a todos os amigos que ganhei, não citarei nomes pois posso esquecer de alguém e seria de uma indelicadeza sem tamanho.

E por último e não menos importante, muito pelo contrário, eu agradeço ao senhor Eduardo Mannarino Correia, meu orientador, agradeço por toda paciência e dedicação em me orientar para que o presente trabalho fosse realizado da melhor maneira possível e agradeço também por todas as vezes que ressaltou que dormir e relaxar também é importante para que as ideias se formem e se organizem de maneira coerente.

EPÍGRAFE

—Vocês podem calar a minha voz, mas não os meus pensamentos! Vocês podem acorrentar meu corpo, mas não a minha mente! Não serei plateia dessa sociedade doente, serei autor da minha história! Os fracos querem controlar o mundo; os fortes, o seu próprio ser! Os fracos usam as armas; os fortes, as ideias!‖

Cury, Augusto Jorge; O Futuro da Humanidade 2005

REFERÊNCIAS

Acesso em: 27 set. 2022.

AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DA AIDS (São Paulo). Há 36 anos, o cientista Luc Montagnier isolou pela primeira vez o vírus da aids. Agência de Notícias da Aids. ed. São Paulo, Brasil, 20 maio 2019. Disponível em: https://agenciaaids.com.br/noticia/ha-36-anos-o-cientista-luc-montagnier-isolou-pela-primeira-vez-o-virus-da-aids/. Acesso em: 4 abr. 2022.

ALVES JOTA, Fernando. OS ANTIRRETROVIRAIS ATRAVÉS DA HISTÓRIA, DA DESCOBERTA ATÉ OS DIAS ATUAIS. In: ALVES JOTA, Fernando. OS

ANTIRRETROVIRAIS ATRAVÉS DA HISTÓRIA, DA DESCOBERTA ATÉ OS DIAS ATUAIS. Orientador: Profª. Eliane Matos dos Santos. 2011. Monografia (Pós Graduação/ Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas) - FioCruz, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/11130/1/72.pdf. Acesso em: 4 abr. 2022.

ANVISA (Brasil). Anvisa aprova novo tratamento para HIV: A possibilidade de doses únicas simplifica o tratamento e a adesão dos pacientes. Brasil: Ministério da Saúde, 30 nov. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2021/11/anvisa-aprova-novo-tratamento-para-hiv#:~:text=A%20Ag%C3%AAncia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia,sub

st%C3%A2ncias%20lamivudina%20e%20dolutegravir%20s%C3%B3dico. Acesso em: 4 abr. 2022.

ANZALONE, Andrew V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. NATURE, [s. l.], v. 576, p. 149 - 157, 21 out. 2019. DOI https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-

BBOSA, Nicholas; KALEEBU, Pontiano; SSEMWANGA, Deogratius. HIV subtype diversity worldwide. Current Opinion HIV AIDS, [s. l.], v. 14, ed. 3, p. 153 - 160, Maio 2019. DOI https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000534. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30882484/. Acesso em: 27 set. 2022.

BROAD INSTITUTE (EUA). CRISPR TIMELINE. Cambridge, Massachusetts, EUA: Broad Institute, 2022. Disponível em: https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/crispr-timeline. Acesso em: 9 set. 2022.

Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41586-019-1711-

EXCISION BIOTHERAPEUTICS (EUA). Study of EBT-101 in Aviremic HIV-1 Infected Adults on Stable ART. EUA: Excision BioTherapeutics, 28 mar. 2022. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05144386. Acesso em: 1 set. 2022.

FIOCRUZ (Rio de Janeiro). Farmanguinhos. Farmanguinhos Lamivudina + Zidovudina. Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil: Farmanguinhos - FIOCRUZ, 2020. Disponível em: https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2020/12/Farmanguinhos-LamivudinaZidovudina_BulaPaciente.pdf. Acesso em: 11 ago. 2022.

FRANGOUL, Haydar et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β-Thalassemia. The New England Journal of Medicine, [s. l.], v. 284, p. 252 - 260, 5 dez. 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2031054. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa2031054?articleTools=true. Acesso em: 26 set. 2022.

GLOBE NEWSWIRE (EUA). Excision recebe liberação da FDA do IND para o teste de fase 1/2 do terapêutico baseado em EBT-101 CRISPR para tratamento do HIV. São Francisco, EUA: GLOBE NEWSWIRE, 15 set. 2021. Disponível em: https://www.globenewswire.com/news-release/2021/09/15/2297456/0/en/Excision-Receives-FDA-Clearance-of-IND-for- Phase-1-2-Trial-of-EBT-101-CRISPR-Based-Therapeutic-for-Treatment-of- HIV.html. Acesso em: 4 abr. 2022.

GOVERNO FEDERAL (Brasil). ATENDIMENTO A POPULACAO COM MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DOS PORTADORES DE HIV/AIDS E OUTRAS DOENCAS SEXUALMENTE TRANSMISSIVEIS. Brasil: Portal da Transparência, 2021. Disponível em: https://www.portaltransparencia.gov.br/programas-e-acoes/acao/4370-atendimento-a-populacao-para-prevencao--controle-e-tratamento-de-hiv-aids--outras-infeccoes-sexualmente-transmissiveis-e-hepatites-virais?ano=2021. Acesso em: 4 abr. 2022.

JINEK, Martin et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. SCIENCE, [s. l.], v. 337, ed. 6096, p. 816 - 821, 17 ago. 2012. DOI DOI: 10.1126/science.1225829. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829. Acesso em: 23 ago. 2022.

LANDER, Eric S. The Heroes of CRISPR. Cell, [s. l.], v. 164, p. 18 - 28, 14 jan. 2016. DOI https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771483/. Acesso em: 23 fev. 2022.

MAKAROVA, Kira et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews | Microbiology, [s. l.], v. 18, ed. 2, p. 67 - 83, Fevereiro 2020. DOI https://doi.org/10.1038/s41579-019- 0299-x. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31857715/. Acesso em: 23 fev. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Indicadores e Dados Básicos do HIV/AIDS nos Municípios Brasileiros: Dados Regionais e Nacionais. Brasil: DCCI/SVS, 2021a. Disponível em: http://indicadores.aids.gov.br/. Acesso em: 1 maio 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. O que é HIV. Brasil: Ministério da Saúde, 2021c. Disponível em: http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-e-hiv. Acesso em: 11 ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Tratamento: HIV. Brasil: Ministério da Saúde, 2021b. Disponível em: http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/hiv/tratamento. Acesso em: 1 maio 2022.

NYAMWEYA, Samuel et al. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. Reviews in Medical Virology, [s. l.], v. 23, p. 221 - 240, 26 fev. 2013. DOI 10.1002/rmv.1739. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444290/. Acesso em: 3 set. 2022.

PFIZER (Brasil). QUAL A DIFERENÇA ENTRE HIV E AIDS?. Brasil, 22 jun. 2022. Disponível em: https://www.pfizer.com.br/noticias/ultimas-noticias/qual-diferenca-entre-hiv-e-aids. Acesso em: 18 ago. 2022.

TURNER, Brian G.; SUMMERS, Michael F. Structural Biology of HIV. J. Mol. Biol., Baltimore, EUA, v. 285, ed. 1, p. 1 - 32, 8 jan. 1999. DOI https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2354. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9878383/. Acesso em: 11 ago. 2022.

ANEXO

Figura 1: Custo Nacional do HIV



Adaptado de (GOVERNO FEDERAL, 2011)

Figura 2: Custo Nacional do HIV



Adaptado de (GOVERNO FEDERAL, 2011)