Alergologia Polska – Polish Journal of Allergology 2021; 8, 4: 183–190
DOI: https://doi.org/10.5114/pja.2021.111801
Received: 16.11.2021, **Accepted:** 1.12.2021.

Alergologia
POLSKA
Polish Journal of Allergology

PRACA POGLĄDOWA/*REVIEW PAPER*

Zastosowanie edycji genomu w terapii – kontekst immunologiczny

Genome editing in therapy: immunological context

Piotr Rieske[1,2,3#]

[1]Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź, Polska
[2]Celther Polska Sp. z o.o., Laboratorium Naukowo-Badawcze, Konstantynów Łódzki, Polska
[3]Personather Sp. z o.o., Konstantynów Łódzki, Polska

STRESZCZENIE

W ramach terapii osób z chorobami genetycznymi proponuje się zastosować edycję genomu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (*induced pluripotent stem cells* – iPSc) lub hematopoetycznych komórek macierzystych (*hematopoetic stem cells* – HSC) ze szpiku chorego. Pozornie wydaje się, że takie podejście pozwala na otrzymanie komórek autogennych. Nie będzie to jednak zawsze przeszczep autologiczny w ścisłym tego pojęcia znaczeniu. Odrzucenie transplantu będzie bardziej prawdopodobne w przypadku chorób recesywnych warunkowanych mutacjami typu nonsens, ponieważ u tych pacjentów białko pojawiające się po edycji genomu będzie „obce" dla organizmu gospodarza, pomimo że zostanie wyprodukowane przez autogenne komórki. Abstrahując od opisywanego powyżej zagadnienia dość unikalnej sytuacji transplantologicznej, wykorzystanie pochodnych iPSc czy komórek HSC z edytowanym genomem wydaje się bardziej obiecujące w przypadku chorób, których objawy zależą od dysfunkcji komórek krwi niż np. w dystrofii mięśniowej lub mukowiscydozie. Edycja genomu jest również stosowana do udoskonalenia autogennych limfocytów T z chimerycznym receptorem antygenowym (*chimeric antigen receptor T-cells* – CAR-T). Edycja genomu w połączeniu z technologią iPSc powinna umożliwić otrzymanie tzw. uniwersalnych komórek do transplantacji, w tym uniwersalnych CAR-T. Edycja genomu jest więc szczególnie istotna w kontekście immunologicznym.

SŁOWA KLUCZOWE

CRISPR-CAS9, edycja genomu, HSC, iPSc, CAR-T.

ABSTRACT

Genome editing of induced pluripotent stem cells (iPSc) or hematopoietic stem cells (HSC) from the patient's bone marrow is proposed as part of the gene therapy. It seems that this approach allows obtaining autogenous cells. However, it will not always be an autologous transplant in the strict sense of this term. Transplant rejection will be more likely to occur in recessive diseases caused by nonsense mutations, since in these patients' organism the protein that appears after genome editing will be "foreign" to the host, although it will be produced by autogenous cells. Apart from the aspect of the quite unique transplant situation described above, the use of iPSc derivatives or HSC cells with an edited genome seems to be more promising in diseases in which

symptoms depend on blood cell dysfunction than, for example, in muscular dystrophy or cystic fibrosis. Genome editing is also used to refine autogenous T cells with chimeric antigen receptor T-cells (CAR-T). Finally, genome editing in combination with iPSc technology should enable the production of the so-called universal cells for transplantation, including universal CAR-T. Genome editing is therefore particularly important in an immunological context.

KEY WORDS

CRISPR-CAS9, genome editing, HSC, iPSc, CAR-T.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Piotr Rieske, Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, Polska, e-mail: piotr.rieske@umed.lodz.pl

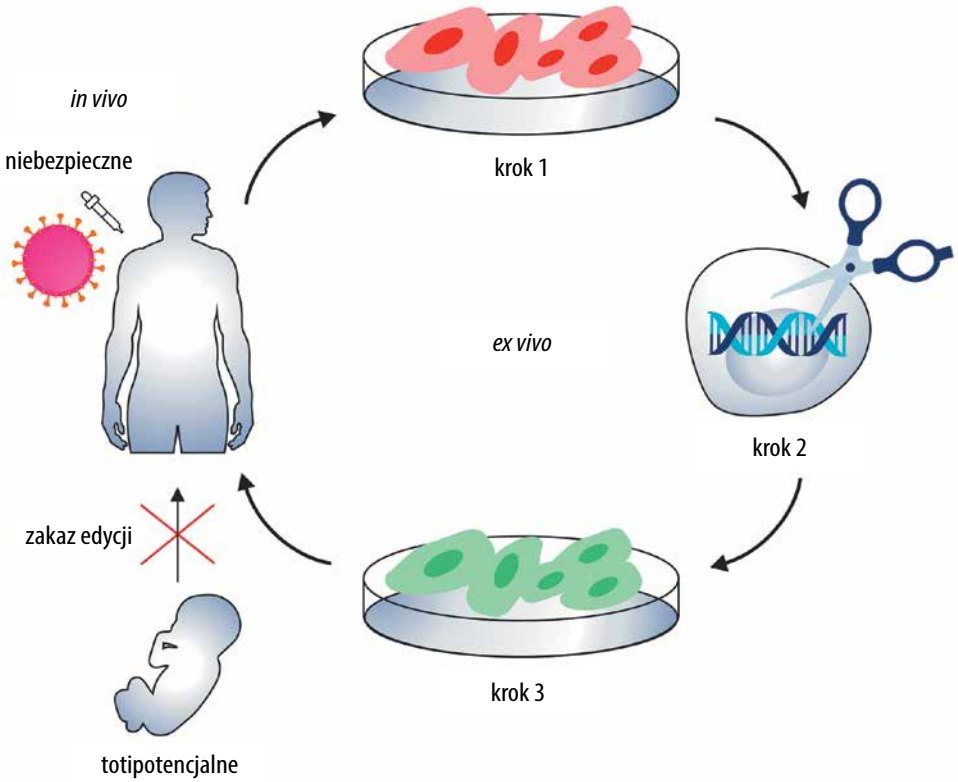
KONSEKWENCJE IMMUNOLOGICZNE ZASTOSOWANIA TECHNIK EDYCJI GENOMU NA POZIOMIE KOMÓREK PLURI- I MULTIPOTENTNYCH

W artykule podjęto próbę przedstawienia złożonych, immunologicznych konsekwencji zastosowania edycji genomu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (*induced pluripotent stem cells* – iPSc) oraz multipotencjalnych komórek macierzystych w celach terapeutycznych.

Za technologię reprogramowania (otrzymywania iPSc) przyznano Nagrodę Nobla w 2012 roku. Największą przeszkodą jej upowszechnienia w terapii jest ryzyko rozwoju potworniaków (*teratoma*). Powoli jednak biotechnolodzy tworzą takie terapie komórkowe zależne od iPSc, aby uniknąć ryzyka rozwoju tych guzów [1]. W przypadku chorób krwi i szpiku edycja hematopoetycznych komórek macierzystych (*hematopoetic stem cells* – HSC) pozwala ominąć ten problem. Z kolei na korzyść iPSc przemawia to, że łatwiej je hodować w warunkach *in vitro* niż HSC, a zatem łatwiej modyfikować. Niemniej metody hodowli HSC są stale udoskonalane. Z immunologicznego punktu widzenia istotne jest to, że reprogramowanie lub też pobranie szpiku prowadzi do otrzymania komórek do przeszczepu autologicznego. Komórki iPSc otrzymuje się z dojrzałych komórek dawcy. Mogą to być komórki skóry czy nawet komórki z osadu moczu. Wydaje się, że połączenie reprogramowania czy pobrania szpiku z technologią edycji genomu gwarantuje uniknięcie problemów powodowanych przez mechanizmy związane z odrzuceniem przeszczepu. Sytuacja jest jednak bardziej skomplikowana. W związku z tym, że większość chorób genetycznych dziedziczy się w sposób recesywny, należy mieć na uwadze, iż połączenie tych metod stwarza pewien problem. W organizmie takiego chorego niekiedy nie stwierdza się przed transplantacją białka prawidłowego, a nawet nieprawidłowego. Sytuacja taka nie występuje, jeśli choroba wynika z mutacji dominującej. W tym przypadku powstaje prawidłowe białko kodowane przez jeden prawidłowy allel genu, którego heterozygotyczna mutacja w drugim allelu warunkuje chorobę i syntezę zmutowanego białka (zazwyczaj na skutek mutacji typu zmiany sensu, *missense*). Jak wskazano, takich chorób genetycznych jest mniej [2]. W przypadku schorzeń dziedziczonych w sposób recesywny możliwe są w uproszczeniu dwie sytuacje: w obrębie białka zmienia się pojedynczy aminokwas (nie przesuwa się ramka odczytu) albo zmiana jest większa, włącznie z brakiem białka wskutek mutacji typu nonsens. Szczególnie ten ostatni przypadek jest niekorzystny dla prób zastosowania edycji genomu na poziomie nietotipotencjalnych komórek macierzystych. W tej sytuacji po zastosowaniu np. multipotencjalnych komórek macierzystych ze zmienionym genomem u dorosłego chorego następuje produkcja białka, z którym układ odpornościowy osoby leczonej się nie zetknął wcześniej. Można więc powiedzieć, że komórki poza produkowanym białkiem są autogenne, ale białko terapeutyczne dla tego osobnika przypomina niekiedy białka odległe filogenetycznie, a obserwowane komplikacje mogą przypominać te, które opisywano w odniesieniu do klasycznej terapii genowej [3]. Sytuacja jest podobna do tych, gdy chory poddawany jest np. terapii z zastosowaniem preparatu białkowego, takich jak w około 10% przypadków hemofilii, kiedy występują mutacje typu nonsens. Oczywiście brak białka czynnika VIII lub IX w organizmie chorego przed podaniem go w terapii nie jest jedyną przyczyną braku tolerancji immunologicznej, ale ta zmienna jest istotna [4, 5]. Chorób warunkowanych występowaniem mutacji typu nonsens jest wiele,

ale nieprzypadkowo wskazano hemofilię, ponieważ zjawisko występowania przeciwciał przeciwko podawanym terapeutycznym preparatom białkowym jest w tym przypadku dobrze opisane, podobnie jak skuteczność edycji genomu komórek z mutacją warunkującą hemofilię za pomocą techniki CRISPR [6, 7]. W przypadku zastosowania autogennych komórek macierzystych zaczynających produkować białko, którego wcześniej komórki osoby poddawanej terapii nie produkowały, problem ten będzie występował częściej [8]. Terapia z wykorzystaniem metod edycji genomu jest jak do tej pory wyjątkowo mocno personalizowana. Poza komórkami autogennymi w zależności od mutacji konieczne jest przygotowanie właściwego sgRNA lub uwzględnienie sekwencji PAM, odpowiedniej dla miejsca edycji. Konsekwencje zastosowania tego podejścia będą bardzo trudne do przewidzenia i odpowiedzi układu odpornościowego pacjentów na te przeszczepy różnorodne.

Bardzo często dyskutuje się, na ile techniki edycji genomu są lepsze od klasycznej terapii genowej. Należy zauważyć, że nadal rozważa się zastosowanie terapii genowych polegających na wprowadzeniu transgenów do komórek chorego. W przypadku chorób recesywnych, w których nie ma efektu nabycia nowej funkcji, klasyczna terapia genowa ma pewne szanse na sukces. Czym innym jest współistnienie transgenu terapeutycznego z genem chorobotwórczym, nawet w przypadku choroby dziedziczonej recesywnie, niż „naprawienie" obu alleli genu z mutacjami. Również w przypadku klasycznej terapii genowej więcej szans wydaje się mieć zastosowanie komórek modyfikowanych *ex vivo*, ponieważ próby modyfikowania za pomocą wirusów niosących transgen leczniczy komórek *in vivo* są o wiele bardziej niebezpieczne dla pacjenta (ryc. 1) [9]. Ponadto w terapii *in vivo* występuje również problem efektywnego dostarczania transgenu do odpowiednich komórek. W terapii



RYCINA 1. W terapii chorób układu immunologicznego edycja genomu może odegrać szczególną rolę. Możliwa jest edycja hematopoetycznych komórek macierzystych, z których powstaną prawidłowe dojrzałe komórki. Wariant z wprowadzeniem wektora *in vivo* wydaje się niebezpieczny dla pacjenta. Wirus może doprowadzić między innymi do zakażenia lub niechcianych zmian w genomie. Ponadto często edycji podlegają komórki dojrzałe, które stosunkowo szybko umierają. Wykorzystanie komórek totipotencjalnych człowieka jest zakazane w terapii. Korzystne wydaje się pozyskanie od pacjenta komórek macierzystych, np. HSC, lub opracowanie dla niego iPSc. Kolejnym etapem przygotowania komórek do celów terapeutycznych powinna być modyfikacja tych komórek dzięki technikom edycji genomu, względnie tradycyjnej terapii genowej *ex vivo*, a następnie, po zróżnicowaniu iPSc do HSC, podanie komórek pacjentowi. HSC mogą być stosowane bezpośrednio, niemniej trudniej je edytować czy ogólnie modyfikować genetycznie

genowej jest to transgen leczniczy, z kolei w przypadku technik edycji genomu – transgen kodujący CAS9 lub białko chimerowe PE. Zastosowane *in vivo* wirusy mogą prowadzić do wystąpienia chorób infekcyjnych czy mutowania genów (miejsce wprowadzenia transgenu jest przypadkowe), a efekty wprowadzenia transgenów do komórek dojrzałych są przejściowe. Wydajność takich zabiegów jest również znikoma. Gen edytowany podlega naturalnej regulacji ekspresji, ponieważ jest kontrolowany przez fizjologiczny promotor. Transgen wprowadzany w trakcie klasycznej terapii genowej ma promotor sztuczny, co również działa na korzyść edycji genomu. Techniki edycji genomu mają przewagę w stosunku do klasycznej terapii genowej również w przypadku chorób genetycznych warunkowanych mutacjami dominującymi. W tych chorobach białko prawidłowe współistnieje w komórkach chorego ze zmutowanym, więc gen zmutowany musi być edytowany do prawidłowego, aby poprawić stan pacjenta. Wprowadzenie kopii transgenu prawidłowego, obok istniejącej kopii genu prawidłowego, nie musi przynieść poprawy. Wiele białek funkcjonuje jako trimery, a nawet tetrametry, w których każda podjednostka musi być prawidłowa. Z kolei prowadzenie prac z komórkami iPSc lub multipotencjalnymi komórkami macierzystymi pozwala na selekcję odpowiednich klonów – takich, które mają genom edytowany w zamierzony sposób, oraz takich, które zawierają odpowiednią liczbę kopii transgenu. Dodatkowo wypada przyznać, że w przypadku terapii *in vivo* wykryto dość wyraźną immunogenność CAS-9, co tym bardziej uzasadnia działania *ex vivo* z koniecznością stosowania transgenu CAS-9 w wektorach episomalnych i jest to zmienna działająca na korzyść klasycznych terapii genowych [10].

Warto w tym miejscu przypomnieć, że obecnie nie wolno edytować genomów ludzkich komórek totipotencjalnych, czyli takich, z których można otrzymać cały organizm ludzki, zarodków, płodów oraz gamet. Można natomiast, jak opisano powyżej, dokonywać edycji genomu autogennych indukowanych komórek pluripotencjalnych, komórek multipotencjalnych i komórek dojrzałych. Uzasadnienie tego zakazu jest skomplikowane i wykraczające poza wady CRISPR-CAS9 czy PE, ale obawa przed powstaniem organizmów ze zmianami w genomie innymi niż zaprojektowane i przekazywanymi do kolejnych pokoleń jest ważną przesłanką. Więcej można się dowiedzieć o zasadach podejmowania takich decyzji chociażby z uzasadnienia wyroku TSUE [11]. Oczywiście edycja genomu na poziomie komórek totipotencjalnych nie powodowałaby problemów związanych z produkcją „obcego" białka przez komórki autogenne. Bez wątpienia zakaz jej prowadzenia na poziomie komórek totipotencjalnych w przypadku ludzi ma poważne podstawy, a terapia na tak wczesnym etapie życia nawet po ewentualnym zniesieniu zakazu nie będzie szybko możliwa. Przyjmując więc do wiadomości orzecznictwo TSUE lub decyzje innych instytucji odpowiedzialnych za regulację działań terapeutycznych z zastosowaniem edycji genomu oraz konieczność ich stosowania po urodzeniu, trzeba liczyć się z tym, że w niektórych przypadkach w trakcie takiej terapii dojdzie do odrzucenia przeszczepu komórkowego. Z merytorycznego punktu widzenia jedną z najważniejszych przesłanek zakazu jest nieprzewidywalność konsekwencji zastosowania technik edycji genomu na poziomie zarodka dla gatunku ludzkiego, wynikająca ze skomplikowanych procesów towarzyszących edycji genomu opisanych w piśmiennictwie [12–15]. Najogólniej ujmując, błędy edycji są eliminowane poprzez selekcję negatywną komórek niepożądanych. Nie ma przy tym zgody na selekcję w celach terapeutycznych spośród tysięcy komórek totipotencjalnych marginalnej populacji wykazującej pożądany genom, tak jak wolno to robić w przypadku komórek pluripotencjalnych czy multipotencjalnych. Ponadto wychwycenie wszystkich błędów wymagałoby sekwencjonowania całego transkryptomu komórek, z bardzo dużym pokryciem, aby wykryć nawet niewielki odsetek komórek z nieplanowanymi zmianami genomu. Wprowadzenie populacji komórek multipotencjalnych z błędnie edytowanym genomem do organizmu biorcy nie wywoła jednak tak negatywnych skutków jak rozwój całego organizmu z takimi błędami w genomie – organizmu, który może je przekazać potomstwu. Z tego powodu zakaz edycji genomu obejmuje również gamety. Niektórzy pacjenci z chorobami genetycznymi kwestionują ten zakaz, ponieważ nawet jeśli sami zostaną wyleczeni, ich potomstwo może być chore. Nawet gdyby takie restrykcje zniesiono, to bez wątpienia edytowanie genetyczne pochodnych hematopoetycznych komórek macierzystych stosować się będzie w terapii osób urodzonych z chorobą genetyczną lub też w przypadku edycji genomów CAR-T.

TECHNOLOGIA EDYCJI GENOMU W CHOROBACH Z DYSFUNKCJĄ KOMÓREK UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

W przypadku CRISPR-CAS9 jedną z pierwszych sytuacji, która przyciągnęła uwagę nie tylko biotechnologów, była próba zablokowania transmisji wirusa HIV w czasie życia płodowego przeprowadzona w Chinach [16]. Wiadomo, że gen kodujący receptory chemokinowe CCR5 i CXCR4 (koreceptory HIV) biorące udział w transmisji wirusa może być edytowany, co umożliwia jej zapobieganie. Procedura przeprowadzona w Chinach wymagała interwencji na etapie życia zarodkowego, co spotkało się nie tylko z dezaprobatą świata naukowego, ale nawet dość permisywnych biotechnologicznie lub bioetycznie władz Chin. Możliwość zastosowania technologii CRISPR-CAS9

w przypadku AIDS nie jest obecnie brana pod uwagę na wczesnych etapach życia zarodkowego lub płodowego, pomimo pewnych sukcesów w trakcie badań na zwierzętach [17]. Możliwe jest również w tym przypadku wykorzystanie pochodnych komórek iPSc czy HSC i zastosowanie w nich edycji np. genu CCR5, a następnie podanie komórek pacjentowi z AIDS [18]. W tym zakresie terapia genowa nie spełni swojej funkcji, ponieważ transgenowi kodującemu receptor chemokinowy wiążący się z białkami HIV będzie towarzyszył transgen kodujący odmianę receptora niewiążącego się z białkami HIV. Jeśli jednak użyje się połączenia technologii iPSc z CRISPR-CAS9 w celu edycji CCR5 i wyselekcjonuje się odpowiednie iPSc, to po wprowadzeniu do organizmu chorego otrzymanych z iPSc limfocytów T pojawi się znacząca populacja limfocytów opornych na HIV. Możliwe jest również oczyszczanie za pomocą edycji genomu limfocytów pacjenta ze zintegrowanego do jego genomu DNA wirusowego [19]. Podejście to stanowi przyczynek do rozważań nad usuwaniem z genomów DNA powstałego na skutek odwrotnej transkrypcji RNA różnych retrowirusów. Także wiele wirusów DNA próbowano eliminować za pomocą CRISPR-CAS9. Były to między innymi wirus opryszczki typu 1 (*Herpes simplex virus* 1 – HSV-1), wirus cytomegalii (CMV) czy wirus Epsteina-Barr (EBV) [20–22]. Ponieważ część wirusów wykorzystuje RNA jako zapis genetyczny, opracowuje się również systemy, które rozpoznają i eliminują ich RNA [23]. Tego typu podejście rozważano nawet w odniesieniu do SARS-CoV-2 [24]. W tym przypadku można nawet powiedzieć, że system CRISPR-CAS9 wrócił do swego pierwotnego działania, ale prowadzi je w komórkach eukariotycznych, a nie bakteryjnych.

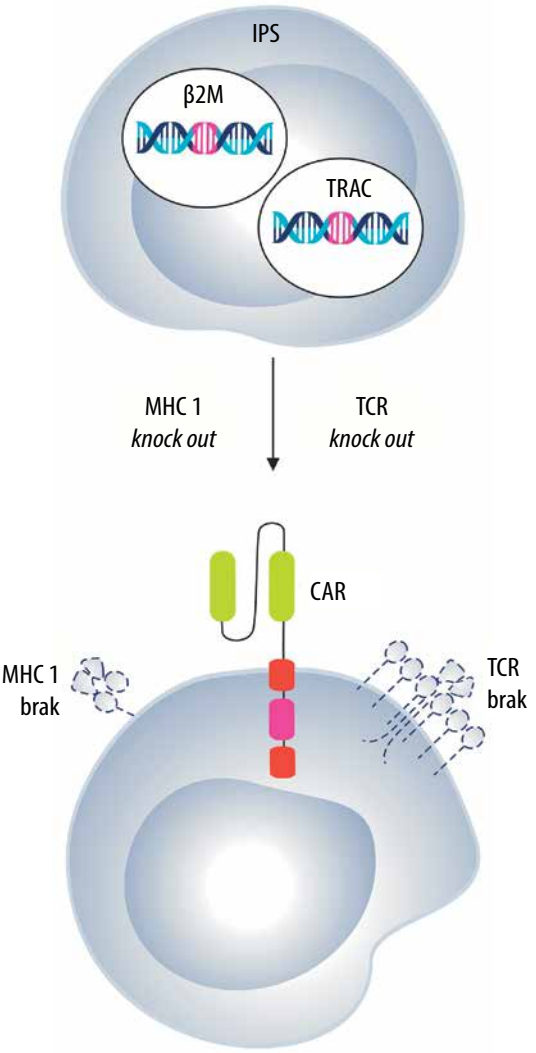
Bardzo dużą grupę chorych, u których można zastosować technologię CRISPR-CAS9 połączoną np. z iPSc, stanowią osoby z mutacjami dziedzicznymi, które powodują niedobory odporności. Technologia iPSc ma większe szanse sukcesu w przypadku chorób, w których komórki transplantowane są do krwiobiegu [25]. Przykładem takiej choroby, nieimmunologicznej, ale traktowanej jako klasyczny przykład zastosowania edycji w połączeniu z reprogramowaniem, może być anemia sierpowatokrwinkowa. W tym przypadku podanie HSC lub erytroblastów ze zmienionym genomem daje szansę na duży sukces terapeutyczny. Oznacza to następującą sekwencję działań: otrzymanie komórek iPSc, np. z komórek moczu pacjenta, ewentualnie bezpośrednio HSC ze szpiku; edycja genomu tych komórek w obrębie genu kodującego hemoglobinę; otrzymanie hematopoetycznych komórek macierzystych ze zmienionym („naprawionym") genem hemoglobiny oraz podanie takich komórek pacjentowi i ich różnicowanie się do erytrocytów *in vivo* po zasiedleniu szpiku. W przypadku różnego typu dziedzicznych anemii trwają badania kliniczne. Choroby, takie jak mukowiscydoza, stanowią trudniejsze wyzwanie, ponieważ pojawienie się np. 20% komórek prawidłowych nie spowoduje tak wyraźnej poprawy jak w przypadku hemofilii.

Tradycyjna terapia genowa, podobnie jak edycja genomu, oferuje pewne rozwiązanie, gdy wprowadzenie transgenu umożliwia pojawienie się brakującego białka. Można tu wskazać ciężki złożony niedobór odporności, warunkowany mutacją genu deaminazy adenozynowej czy zespół Wiskotta-Aldricha [26–28]. Terapia genowa może być zastosowana także w przypadku komórek iPSc. Oczywiście podobnie w przypadku chorób immunologicznych, w których dochodzi do mutacji typu nonsens i które są warunkowane recesywnie, przeszczep komórek nie będzie *stricte* autologiczny. Niejednokrotnie jednak w chorobach immunologicznych obserwowane symptomy wynikają z nabycia nowych funkcji przez zmutowane białko i chorób genetycznych warunkowanych mutacją dominującą, a więc białko prawidłowe również jest obecne w komórkach chorego. Kiedy rozważa się tradycyjną terapię genową, nie można wyeliminować tego zjawiska. Umieszczonemu w komórce transgenowi o prawidłowej sekwencji towarzyszy gen zmutowany. Z kolei udana edycja genomu pozwala na zmianę zmutowanego genu, usuwając w ten sposób nabycie nowej funkcji. W takich przypadkach występuje wyraźna przewaga metod edycji genomu nad klasyczną terapią genową. Przykładem takiej choroby jest agammaglobulinemia dziedziczona w sposób sprzężony z chromosomem X oraz zespół aktywnego PI3K-δ [29, 30].

Choroby nowotworowe należą również do takich, w których dochodzi do dysfunkcji układu odpornościowego. Dlatego następnym, bardzo ważnym przykładem jest próba połączenia technologii edycji genomu z terapią z zastosowaniem limfocytów T z chimerowym receptorem antygenowym (*chimeric antigen receptors T cells* – CAR-T). CAR-T to nowy rodzaj terapii immunologicznej. Dzięki powstaniu białka chimerowego z połączenia domeny zmiennej przeciwciała rozpoznającego antygen nowotworowy z domenami transdukcji sygnału limfocytów cytotoksycznych powstaje funkcjonalna chimera limfocytu B i T, czyli limfocyt cytotoksyczny, który rozpoznaje bezpośrednio błonowy antygen nowotworowy za pomocą części immunoglobulinowej CAR. Nie ma potrzeby interakcji TCR z kompleksem antygen–MHC [31]. Jedną z przyczyn zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego w chorobach nowotworowych jest immunosupresja komórek układu odpornościowego na skutek interakcji receptora PD1 z ligandem PD-L1 [32]. Za pomocą technologii CRISPR-CAS9 czy PE można próbować usunąć geny kodujące białka uczestniczące w tej interakcji i w ten sposób utrudnić komórkom nowotworowym neu-

tralizowanie ataku komórek CAR-T [33]. Powodów edycji genomu CAR-T jest jednak dużo więcej [34].

Ostatnim przykładem zastosowania edycji genomu w tym opracowaniu jest tworzenie komórek do uniwersalnych transplantacji (dla każdego pacjenta). Stosowana dotychczas w klinice technologia CAR-T wymaga wykorzystania komórek od pacjenta, który jest leczony. Znacznie utrudnia to procedurę, wydłuża czas do podania terapii CAR-T pacjentowi i zmniejsza szansę jej powodzenia, zwłaszcza gdy pacjent był poddawany wcześniej długotrwałej terapii, która uszkodziła jego komórki. W tej sytuacji próbuje się tworzyć tzw. uniwersalne CAR-T. W przypadku prób opracowania tzw. uniwersalnych CAR-T w grę wchodzi nawet połączenie technologii iPSc z CRISPR-CAS9 czy PE. W otrzymaniu uniwersalnych CAR-T należy zapobiec zarówno odrzuceniu przeszczepu obcych komórek, jakimi byłyby takie „obce" CAR-T, jak i atakowi uniwersalnych CAR-T przeciwko prawidłowym komórkom gospodarza. Należy więc za pomocą CRISPR-CAS9 czy PE usunąć (*knock out*) odpowiednie geny HLA oraz geny, takie jak TRAC. Wszystkie te manipulacje zdecydowanie łatwiej wykonywać na poziomie komórek, takich jak iPSc, które stosunkowo łatwo namnażać w warunkach *in vitro* (ryc. 2). Następnie z takich komórek można otrzymywać w wyniku różnicowania dowolną liczbę uniwersalnych CAR-T. Zapewne eliminacja odpowiednich genów HLA może pozwolić na otrzymanie komórek uniwersalnych do różnych celów, nie tylko do otrzymywania CAR-T. Jednak CAR-T stawia wyższe wymagania, ponieważ trzeba dokonać takiej edycji genomu, która zapewni ochronę zarówno przed odrzuceniem przeszczepu, jak i przed atakiem komórek przeszczepionych na komórki gospodarza. W przypadku wielu innych komórek, które można wykorzystać do uniwersalnego przeszczepu, a które nie wykazują ekspresji TCR, nie ma potrzeby ingerencji w geny, takie jak TRAC, a wystarczy dokonać usunięcia genu kodującego np. β2-mikroglobulinę, bez której MHC nie działa [35, 36]. Należy pamiętać, że usuwane w trakcie takiej edycji geny HLA nie powstały bez powodu, a takie komórki mogą stać się rezerwuarem patogenów albo zmienić się w komórki nowotworowe. Manipulacjom można poddawać także inne komórki układu odpornościowego niż limfocyty. W ostatnim czasie powstają nie tylko CAR-T, lecz także makrofagi z chimerowym receptorem antygenowym (*chimeric antigen receptor macrophages* – CAR-M) [37].



RYCINA 2. Opracowanie uniwersalnych CAR-T. Działanie to dla każdego pacjenta wymaga usunięcia genów kodujących dwa typy białek: takich, które mogą spowodować odrzucenie przeszczepu, oraz tych, które mogą prowadzić do odpowiedzi typu przeszczep przeciwko gospodarzowi, ponieważ przeszczepia się limfocyty T. W pierwszym przypadku chodzi o geny, takie jak gen dla β2-mikroglobuliny, która uczestniczy w prezentacji antygenów. W drugim przypadku chodzi o geny związane z białkiem TCR. Wykonanie tego typu modyfikacji nie może odbyć się na poziomie limfocytów T. Potrzebne są do tego albo komórki iPSc, albo HSC. Taka zmiana wymaga zastosowania edycji genomu typu *knock out* albo innej, bardziej skomplikowanej edycji. Wprowadzenie transgenu CAR może się odbyć na etapie iPSc, MHC lub limfocytów otrzymanych z komórek macierzystych. Zmodyfikowano na podstawie http://www.crisprtx.com/programs/immuno-oncology [38]

PODSUMOWANIE

Układ odpornościowy zajmuje szczególne miejsce w zakresie stosowania technologii edycji genomu. Bierze się tu pod uwagę kilka zmiennych pozytywnych i negatywnych z punktu widzenia potencjału terapii z użyciem edycji genomu. Komórki, których genom poddano edycji, mogą być odrzucane przez układ odpornościowy, pomimo że iPSc lub HSC, z których je otrzymano, były autogenne. Nie ma obecnie możliwości edycji genomów płodów ludzkich, genomów komórek totipotencjalnych lub gamet w celach terapeutycznych. Terapie zależne od edycji geno-

mu komórek pacjentów z chorobami genetycznymi prowadzącymi do niedoboru odporności mają większe szanse na sukces niż w przypadku chorób, takich jak dystrofia mięśniowa czy mukowiscydoza. Edycje genów, np. HLA, umożliwiają otrzymanie komórek uniwersalnych (dla dowolnego biorcy), znacznie skracając czas oczekiwania pacjenta na leczenie. Techniki edycji genomu są stosowane w terapii chorób infekcyjnych lub łączone w onkologii z terapiami CAR-T czy CAR-M, które są fundamentalnie immunologiczne.

PODZIĘKOWANIA

Publikacja finansowana ze środków Agencji Badań Medycznych w ramach projektu Polish Chimeric Antigen Receptor T-cell Network, numer 2020/ABM/04/00002.

Podziękowania dla byRieske za pomoc w przygotowaniu rycin.

KONFLIKT INTERESÓW

Autor nie zgłasza konfliktu interesów.

PIŚMIENNICTWO

1. Bedel, A, Beliveau F, Lamrissi-Garcia I, et al. Preventing pluripotent cell teratoma in regenerative medicine applied to hematology disorders. Stem Cells Transl Med 2017; 6: 382-93.
2. Xiao Q, Lauschke VM. The prevalence, genetic complexity and population-specific founder effects of human autosomal recessive disorders. NPJ Genom Med 2021; 6: 41.
3. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 2003; 348: 255-6.
4. Scott DW. Gene therapy for immunologic tolerance: using bone marrow-derived cells to treat autoimmunity and hemophilia. Curr Stem Cell Res Ther 2011; 6: 38-43.
5. Hofbauer CJ, Whelan SFJ, Hirschler M, et al. Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. Blood 2015; 125: 1180-8.
6. Evans GL, Morgan RA. Genetic induction of immune tolerance to human clotting factor VIII in a mouse model for hemophilia A. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 5734-9.
7. Huai C, Jia C, Sun R, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic and germline gene correction to restore hemostasis in hemophilia B mice. Hum Genet 2017; 136: 875-83.
8. Drysdale CM, Tisdale JF, Uchida N. Immunoresponse to gene-modified hematopoietic stem cells. Mol Ther Methods Clin Dev 2019; 16: 42-9.
9. Sii-Felice K, Giorgi M, Leboulch P, et al. Hemoglobin disorders: lentiviral gene therapy in the starting blocks to enter clinical practice. Exp Hematol 2018; 64: 12-32.
10. Crudele JM, Chamberlain JS. Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies. Nat Commun 2018; 9: 3497.
11. Masnicki J. Godność człowieka w świetle orzeczenia Oliver Brustle przeciwko Greenpeace EV (C-34/10). Zeszyty Prawnicze 2016; 13: 193.
12. European Group on Ethics in Science and New Technologies. Ethics of Genome Editing. European Commission, Luxembourg 2021.
13. Naeem M, Majeed S, Hoque MZ, et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. Cells 2020; 9: 1608.
14. Tang L, Zeng Y, Du H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. Mol Genet Genomics 2017; 292: 525-33.
15. Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, et al. Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. Proc Natl Acad Sci USA 2021; 118: e2004832117.
16. Greely HT. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. J Law Biosci 2019; 6: 111-83.
17. Schmidt JK, Strelchenko N, Park MA, et al. Genome editing of CCR5 by CRISPR-Cas9 in Mauritian cynomolgus macaque embryos. Sci Rep 2020; 10: 18457.
18. Kang HJ, Minder P, Park MA, et al. CCR5 disruption in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 provides selective resistance of immune cells to CCR5-tropic HIV-1 virus. Mol Ther Nucleic Acids 2015; 4: e268.
19. Dash PK, Kaminski R, Bella R, et al. Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected humanized mice. Nat Commun 2019; 10: 2753.
20. van Diemen FR, Kruse EM, Hooykaas MJG, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. PLoS Pathog 2016; 12: e1005701.
21. Xiao J, Deng J, Zhang Q, et al. Targeting human cytomegalovirus IE genes by CRISPR/Cas9 nuclease effectively inhibits viral replication and reactivation. Arch Virol 2020; 165: 1827-35.
22. Kanda T, Furuse Y, Oshitani H, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated cloning and functional characterization of gastric cancer-derived Epstein-Barr virus strains. J Virol 2016; 90: 4383-93.
23. O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature 2014; 516: 263-6.
24. Nguyen TM, Zhang Y, Pandolfi PP, et al. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. Cell Res 2020; 30: 189-90.
25. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β-thalassemia. N Engl J Med 2021; 384: 252-60.
26. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. Science 1995; 270: 470-5.
27. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. Science 2013; 341: 1233151.
28. Pavel-Dinu M, Wiebking V, Dejene BT, et al. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells. Nat Commun 2019; 10: 1634.
29. Gray DH, Villegas I, Long J, et al. Optimizing integration and expression of transgenic bruton's tyrosine kinase for CRISPR-Cas9-mediated gene editing of X-linked agammaglobulinemia. CRISPR J 2021; 4: 191-206.
30. Jia Y, Yang Q, Wang Y, et al. Hyperactive PI3Kδ predisposes naive T cells to activation via aerobic glycolysis programs. Cell Mol Immunol 2021; 18: 1783-97.
31. Kierasinska A, Ciunowicz D, Wegierska M, et al. CAR-T therapy in oncology and other fields of medicine. Pol J Allergol 2021; 8: 77-91.

32. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. Sci Rep 2017; 7: 737.
33. Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. Nature 2018; 559: 405-9.
34. Razeghian E, Nasution MKM, Rahman HS. A deep insight into CRISPR/Cas9 application in CAR-T cell-based tumor immunotherapies. Stem Cell Res Ther 2021; 12: 428.
35. Xu H, Wang B, Ono M, et al. Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility. Cell Stem Cell 2019; 24: 566-78.e7.
36. Frederiksen HR, Doehn U, Tveden-Nyborg P, et al. Non-immunogenic induced pluripotent stem cells, a promising way forward for allogenic transplantations for neurological disorders. Front Genome Ed 2021; 2: 623717.
37. Navarro-Guerrero E, Tay C, Whalley JP, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9-knockout in human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived macrophages. Sci Rep 2021; 11: 4245.
38. http://www.crisprtx.com/programs/immuno-oncology