



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tinkara KREFT

**UPORABA TEHNIK PREUREJANJA GENOMA ZA
RAZVOJ UČINKOVITEJŠIH CELIČNIH TERAPIJ
CAR-T**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tinkara KREFT

**UPORABA TEHNIK PREUREJANJA GENOMA ZA RAZVOJ
UČINKOVITEJŠIH CELIČNIH TERAPIJ CAR-T**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**APPLICATION OF GENOME EDITING TECHNOLOGIES IN
DEVELOPMENT OF MORE EFFECTIVE CAR-T CELL**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Jerneja Ogorevca.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Jernej OGOREVC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Jana Murovec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum predstavitve: 25. 8. 2020

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 606:616-006.6:602.68(043.2)
KG	CAR-T, preurejanje genoma, imunoterapija, rak, CRISPR/Cas, celična terapija
AV	KREFT, Tinkara
SA	OGOREVC, Jernej (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	UPORABA TEHNIK PREUREJANJA GENOMA ZA RAZVOJ UČINKOVITEJŠIH CELIČNIH TERAPIJ CAR-T
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 20 str., 2 pregl., 2 sl., 54 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Terapija z modificiranimi limfociti T (CAR-T) je ena najsodobnejših oblik imunoterapije za zdravljenja raka. Temelji na genetsko spremenjenih, pacientu avtolognih celicah T, ki na svoji površini izražajo himerni antigenski receptor (ang. chimeric antigen receptor ali CAR). Ta je sposoben prepoznati tumorske antigene in sprožiti imunski odziv preko limfocitov T. Terapija s celicami CAR-T trenutno omogoča zdravljenje nekaterih oblik levkemij. Širšo uporabo omejuje zapleten in drag proces priprave celic CAR-T, majhno število znanih tumor-specifičnih antigenov, proti katerim bi usmerili delovanje CAR, slabo protitumorsko delovanje in preživetje celic CAR-T v toksičnem tumorskem mikrookolju ter neželeni stranski učinki terapije. Ena izmed strategij premagovanja omenjenih ovir je uporaba tehnik za preurejanje genoma na celicah CAR-T. Preko vodenih nukleaz, kot so ZFN, TALEN in CRISPR/Cas, lahko v genomu celic T ustvarimo mestno-specifične dvoverižne prelome DNA, ki aktivirajo popravljalne mehanizme. Te izkoriščamo za ustvarjanje zelenih modifikacij v genomu celic CAR-T, kar bi lahko v prihodnosti omogočalo učinkovitejše in varnejše terapije. Trenutne strategije za razvoj učinkovitejših CAR-T terapij z uporabo genomskega preurejanja se usmerjajo predvsem v pripravo alogenih celic CAR-T, saj bi tako poenostavili proizvodnjo in naredili terapijo cenovno dostopnejšo. Cilj je tudi identifikacija dodatnih tumor-specifičnih antigenov, ki bi omogočili izboljšanje specifičnosti delovanja terapij CAR-T, in razvoj celic CAR-T, ki bi sposobnost proliferacije ohranjale tudi <i>in vivo</i> . V prihodnosti lahko pričakujemo nove celične terapije CAR-T, ki ne bodo le varnejše in učinkovitejše, temveč bodo omogočale tudi zdravljenje širšega spektra obolenj.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 606:616-006.6:602.68(043.2)
- CX CAR-T, genome editing, immunotherapy, cancer, CRISPR/Cas, cell therapy
- AU KREFT, Tinkara
- AA OGOREVC, Jernej (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2020
- TI APPLICATION OF GENOME EDITING TECHNOLOGIES IN DEVELOPMENT OF MORE EFFECTIVE CAR-T CELL THERAPIES
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 20 p., 2 tab., 2 fig., 54 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Therapy with modified T lymphocytes (CAR-T) is one of the most modern forms of immunotherapy for cancer treatment. It is based on genetically modified, autologous T cells, which express a chimeric antigen receptor (CAR) on their surface. This receptor is able to recognize tumor antigens and trigger a T lymphocytes - mediated immune response. CAR-T cell therapy currently enables treatment of some forms of leukemia. Extensive use is limited by the complex and expensive process of making CAR-T cells, lack of known tumour target antigens, poor antitumor efficacy and survival of CAR-T cells in a toxic tumor microenvironment, and side effects of the therapy. One of the strategies to overcome these barriers is the use of genome editing on CAR-T cells. Guided nucleases such as ZFN, TALEN and the CRISPR/Cas system introduce site-specific DNA double-strand breaks in the T cell genome, activating repair mechanisms, which are used to create desired modifications of the genome. Genome edited CAR-T cells may result in more effective and safer therapies in the future. Current strategies are primarily focused on the development of allogeneic CAR-T cells, as this would simplify production and make therapy more affordable. The aim is also to identify additional tumor-specific target antigens and develop CAR-T cells with better antitumor efficacy that would maintain the ability to proliferate *in vivo*. In the future, we can expect new CAR-T cell therapies, which will not only be safer and more effective, but will also enable the treatment of a wider range of diseases.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 TERAPIJA S CELICAMI CAR-T	1
2.1 ZGRADBA IN DELOVANJE CAR	2
2.2 PROIZVODNJA CELIC CAR-T	3
3 TEHNIKE PREUREJANJA GENOMA	4
3.1 PRINCIP DELOVANJA VODENIH NUKLEAZ	4
3.1.1 Nukleaza z motivi cinkovih prstov	5
3.1.2 Nukleaza TAL-efektorja	5
3.1.3 Tehnologija CRISPR/Cas	5
3.2 DOSTAVA SISTEMOV ZA UREJANJE GENOMA V CELICE T	7
4 STRATEGIJE RAZVOJA TERAPIJ CAR-T S PREUREJANJEM GENOMA	7
4.1 RAZVOJ ALOGENIH CELIC CAR-T	7
4.1.1 Bolezen presadka proti gostitelju	9
4.1.2 Učinek gostitelja proti presadku	10
4.2 RAZŠIRITEV SPEKTRA POTENCIALNIH TARČNIH ANTIGENOV	11
4.3 RAZVOJ CELIC CAR-T Z BOLJŠO UČINKOVITOSTJO PROTITUMORSKEGA DELOVANJA	11
5 OMEJITVE UPORABE TEHNIK PREUREJANJA GENOMA IN MOŽNE REŠITVE	13
5.1 IZVENTARČNI UČINKI	13
5.2 DRUGE OMEJITVE	14
6 ZAKLJUČEK	15
7 VIRI	16

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Primerjava različnih tipov vodenih nukleaz za genomsko preurejanje	6
Preglednica 2: Trenutne klinične raziskave za razvoj terapij z alogenimi celicami CAR-T	9

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Terminologija CAR: komponente, generacije in signali	3
Slika 2: Proizvodnja alogenih celic CAR-T	8

1 UVOD

Sposobnost imunskega sistema, da prepozna in napade rakave celice, je znana že od začetka 20. stoletja. To sposobnost danes izkoriščamo v terapevtske namene, predvsem pri presajanju krvotvornih matičnih celic. Razumevanje mehanizma aktivacije limfocitov T ob prisotnosti antigenov, značilnih za tumorske celice, je omogočilo razvoj nove oblike imunoterapije, terapije z modificiranimi limfociti T z izraženim himernim antigenskim receptorjem (celična terapija CAR-T, ang. chimeric antigen receptor T cell therapy).

Terapija CAR-T temelji na uporabi gensko spremenjenih, pacientu avtolognih, limfocitov T oz. celic T, ki imajo na svoji površini izražen sintetični receptor za prepoznavanje specifičnih antigenov, prisotnih na površini rakastih celic. Ta receptor omogoča prepoznavanje rakastih celic in indukcijo T-celičnega odziva.

Od prve odobritve takšne terapije, leta 2017, pa do danes sta registrirani dve zdravili, ki temeljita na celicah CAR-T. Omogočata zdravljenje določenih oblik B-celične akutne limfoblastne levkemije, difuznega velikoceličnega limfoma B in primarnega mediastinalnega velikoceličnega limfoma B. Razvoj terapij za zdravljenje drugih rakavih obolenj, tako krvnih kot tumorjev trdnih tkiv, omejujejo neželeni učinki terapije, iskanje ustreznih tarčnih antigenov, omejen čas delovanja celic CAR-T *in vivo*, premagovanje imunosupresivnih mehanizmov in drugo.

Za premagovanje številnih ovir se danes lahko poslužujemo tehnik preurejanja genoma, kot je na primer tehnologija CRISPR/Cas9. Le-te imajo sposobnost tarčnega ustvarjanja sprememb v dednem zapisu posamezne celice. S spreminjanjem genoma celic T bodo terapije CAR-T potencialno varnejše, učinkovitejše in dostopnejše.

2 TERAPIJA S CELICAMI CAR-T

Celična terapija CAR-T velja za eno najsodobnejših oblik imunoterapije za zdravljenje raka. Zdravilo predstavljajo bolnikove celice T, ki so *ex vivo* spremenjene tako, da uničijo rakave celice. To jim omogoča himerni antigenski receptor (CAR), izražen na njihovi površini. Ker je ustvarjen umetno, lahko njegovo zgradbo prilagodimo tako, da bo delovanje celic CAR-T usmerjeno proti specifičnim tarčnim celicam. To kaže na velik potencial za razvoj novih CAR-T celičnih terapij, s katerimi bi v prihodnosti lahko zdravili širok spekter rakavih obolenj, avtoimunske bolezni, kronična vnetna obolenja, zavrnitve presadka po transplantaciji in druga bolezenska stanja (Maldini in sod., 2018).

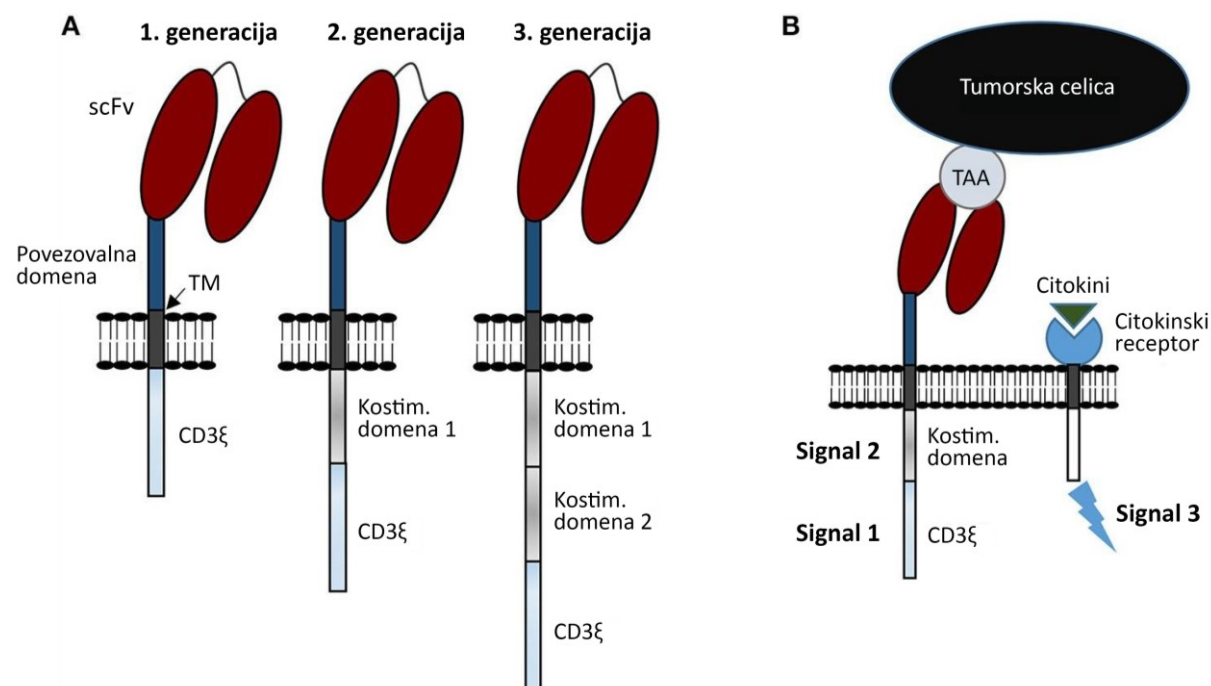
Trenutno terapija CAR-T omogoča zdravljenje hujših oblik nekaterih levkemij. Zaradi pogostih stranskih učinkov in visoke cene priprave celic CAR-T, ta oblika zdravljenja zaenkrat še ne predstavlja uveljavljene oblike zdravljenja, a ima velik pomen pri zdravljenju bolnikov, pri katerih ostale strategije niso učinkovale (Guedan in sod., 2019).

2.1 ZGRADBA IN DELOVANJE CAR

Himerni antigenski receptorji so rekombinantni receptorji, ki usmerijo delovanje celic T proti tarčnim celicam, ki na svoji površini izražajo specifičen antigen. V primeru interakcije CAR s komplementarno tarčno molekulo na površini tumorske celice (npr. CD19) pride do aktivacije celice T, ki začne delovati proti tumorski celici. Inducira se sekrecija citokinov, eksocitoza citotoksičnih granul, ki vsebujejo perforine in grancime ter izražanje ligandov in faktorjev tumorske nekroze. Vse to vodi v apoptozo tarčnih oz. rakavih celic (Benmebarek in sod., 2019).

Prepoznavanje tarče deluje neodvisno od pglavitnega histokompatibilnega kompleksa (ang. major histocompatibility complex ali MHC), ki sicer predstavi peptidne delce običajnim T-celičnim receptorjem (TCR). S tem terapija CAR-T vsaj delno zaobide mehanizme tumorskih celic, ki onemogočajo prepoznavo s strani običajnih celic T. V nasprotju s TCR pa so CAR omejeni le na prepoznavanje površinskih tarčnih molekul, ki pa so lahko proteinske ali neproteinske narave (Guedan in sod., 2018; Benmebarek in sod., 2019).

Za učinkovitost terapije je zelo pomembna zgradba CAR (Li in sod., 2020). CAR sestavlja več domen. Ekstracelularna domena (običajno enoverižni variabilni fragment (scFv) protitelesa), ki omogoča vezavo na specifično tarčo, povezovalna domena, ki omogoča fleksibilnost vezavne domene, transmembranska domena, ki sidra CAR v celično membrano, ter ena ali več intracelularnih domen, ki prenašajo signal za aktivacijo T-celičnega odziva. Najpogostejša signalna oz. aktivacijska domena je CD3-zeta (CD3 ζ) veriga TCR, dopolnjuje jo lahko še kostimulatorna domena, ki izboljša ekspanzijo in obstojnost celic CAR-T *in vivo*. Glede na število kostimulatornih domen lahko CAR klasificiramo v različne generacije (Guedan in sod., 2018). Prva generacija CAR ne vsebuje kostimulatorne domene, zanjo danes velja nizka učinkovitost protitumorskega delovanja. Druga generacija poleg osnovne aktivacijske domene vsebuje še kostimulatorno domeno, kot je CD28 ali 4-1BB. Celice CAR-T druge generacije so pokazale višjo raven produkcije citokinov in boljšo obstojnost ter učinkovitost *in vivo*, kar je vodilo v odobritev prvih dveh terapij za zdravljenje s celicami CAR-T. Tretja generacija CAR vsebuje več kot eno kostimulatorno domeno, njihovo učinkovitost trenutno še preverjajo in primerjajo s CAR druge generacije (Gao in sod., 2019; Depil in sod., 2020). V naslednjih generacijah celic CAR-T se pričakuje še dodatne funkcionalne elemente, kot so interleukinski transgeni za izboljšanje potentnosti, dodatni geni za kemokinske receptorje za izboljšanje dostave celic T, samomorilski geni in regulacijski elementi, ki bi izboljšali varnost in obvladljivost terapije (Li in sod., 2020).



Slika 1: Zgradba CAR različnih generacij – komponente in prenos signalov. A: Himerni antigeni receptor (CAR) je sestavljen iz treh komponent: enoverižni variabilni fragment (scFv), ki prepozna s tumorjem povezani antigen (ang. tumor associated antigen ali TAA), kostimulatorne domene in aktivacijske domene CD3 ξ . Prva generacija CAR je bila ustvarjena brez kostimulatorne domene, druga generacija z eno in tretja z dvema kostimulatornima domenama. B: Za optimalno delovanje potrebuje celica CAR-T tri signale: signal 1 predstavlja aktivacija preko CD3 ξ , signal 2 kostimulacija in signal 3 stimulacija s citokini. TM, transmembranska domena (DeRenzo in Gottschalk, 2019).

2.2 PROIZVODNJA CELIC CAR-T

Pridobivanje avtolognih celic CAR-T je trenutno še nestandardiziran proces. Kljub variabilnosti pristopov pa so ključni koraki proizvodnje večinoma enaki (Vormittag in sod., 2018).

Proizvodnja se začne s pridobivanjem pacientovih levkocitov preko t.i. levkafereze. Sledi spiranje, preko katerega se odstranijo antikoagulantni, in dodatna ločba celic na specifične podtippe. S to ločbo lahko med drugim vplivamo na optimalno končno razmerje CD4⁺ in CD8⁺ celic T, ki pa še ni popolnoma raziskano in definirano. Ločbo podtipov celic običajno izvajajo s pomočjo specifičnih protiteles vezanih na magnetne delce (Zhang in sod., 2017).

Sledi aktivacija celic T, ki posnema aktivacijo *in vivo*. V telesu so naivne celice T stimulirane k proliferaciji in diferenciaciji preko antigen predstavitev celic (APC). Interakcija TCR na celicah T in MHC s predstavljenim peptidom na APC vodi v aktivacijo celic T. Takšna aktivacija bi bila mogoča tudi v proizvodnem postopku celic CAR-T, vendar so danes že razviti enostavnejši postopki, ki zaobidejo kokultivacijo celic T z APC. Najbolj pogosta je uporaba umetno ustvarjenih antigen predstavitev celic ali celic (Vormittag in sod., 2018).

Šele po aktivaciji je možna genska modifikacija, preko katere se v genom celic T vključi zapis za CAR. Integracijo se lahko izvede z različnimi metodami vnosa, npr. elektroporacijo samostojne molekule DNA, preko sistema transpozon/transpozaza, virusnih vektorjev (npr. retrovirusni in lentivirusni vektorji), ... (Zhang in sod., 2017).

Zadnji korak pred shranjevanjem ali končno uporabo je ekspanzija celic CAR-T. Ta del procesa omogoča, da je v končnem produktu ustrezno število celic. Celice se običajno kultivira v posebnih vrečkah na nihajočih podstavkih (npr. WAVE bioreaktorji), statičnih kultivacijskih vrečkah ali klasičnih posodah za gojenje celičnih kultur. Tekom tega procesa je potrebna redna menjava gojišča, kar zahteva ustrezne prostore, opremo in usposobljeno osebje (Vormittag in sod., 2018).

3 TEHNIKE PREUREJANJA GENOMA

Sodobne tehnologije genomskega preurejanja predstavljajo novo orodje, s katerim lahko izboljšamo trenutne pomanjkljivosti CAR-T celične terapije. Izraz genomsko preurejanje (ang. genome editing) se danes nanaša predvsem na tehnike, ki temeljijo na uporabi vodenih nukleaz, kot so ZFN, TALEN in CRISPR/Cas. Z njimi lahko dosegamo usmerjene modifikacije genoma (Mollanoori in sod., 2018).

Te tehnike imajo kar nekaj lastnosti, ki so zaželjene pri pripravi terapevtskih celic. So relativno enostavne (predvsem sistem CRISPR/Cas), visoko učinkovite, prilagodljive, relativno poceni, omogočajo hkratno preurejanja večih lokusov (ang. multiplex gene editing) in so uporabne za širok spekter celičnih kultur (Mollanoori in sod., 2018).

3.1 PRINCIP DELOVANJA VODENIH NUKLEAZ

Princip delovanja vodenih nukleaz temelji na ustvarjanju mestno-specifičnih dvoverižnih prelomov (DSB). Ti nato inducirajo naravno prisotne popravljalne mehanizme. Prav odkritje teh mehanizmov je bil ključen korak pri razvoju tehnik genomskega preurejanja. Dve najbolj pogosti popravljalni poti sta nehomologno spajanje koncev (ang. non-homologous end-joining ali NHEJ) in popravljanje preko homologne rekombinacije (ang. homology-directed repair ali HDR). HDR lahko poteče, kadar je tekom popravljanja DSB prisotna homologna matrična DNA, s pomočjo katere se lahko v genom na želeno mesto vgradi novo zaporedje. Nasprotno NHEJ popravljalni mehanizem deluje neodvisno od matrice in omogoča direktno ligacijo nastalih koncev DNA. Pri tem pogosto pride do zamika bralnega okvirja, zaradi insercije ali delecije nukleotidov na koncih preloma (Takata in sod., 1998).

Ustvarjanje DSB na točno določenih mestih DNA in indukcijo specifičnih popravljalnih mehanizmov lahko danes izvajamo preko uporabe vodenih nukleaz ter izkoriščamo za modifikacije genoma terapevtskih celic (Maeder in Gersbach, 2016).

3.1.1 Nukleaza z motivi cinkovih prstov

Prvo širše uporabljeno tehniko genomskega preurejanja predstavljajo nukleaze z motivi cinkovih prstov (ang. zinc finger nucleases ali ZFN). To so himerni proteini sestavljeni iz specifične DNA vezavne domene, ki jo predstavljajo t.i. cinkovi prsti, in nespecifične nukleazne domene, pridobljene iz restrikcijskega encima FokI tipa II S. Posamezen cinkov prst (gradi) 30 aminokislin, ki se vežejo na določene kombinacije treh nukleotidov (Kim in sod., 1996). Vezavo na specifično DNA zaporedje lahko dosežemo z uporabo različnih kombinacij 3-6 enot cinkovih prstov, ki skupaj prepoznajo 6-18 baznih parov (bp) dolgo zaporedje molekule DNA. Opisane himerne nukleaze postanejo aktivne v obliki dimera, ko se dve monomerni nukleazi vežeta na nasprotni verigi DNA dovolj blizu skupaj. Med vezavnima domenama obeh monomerov je običajno 5 ali 6 bp, kamor dostopa katalitična domena nukleaze in prekine dvojno vijačnico – povzroči nastanek DSB (Porteus in sod., 2005).

Slabosti te metode so vezane predvsem na težavno in zamudno pripravo proteinov s specifičnim vezavnim mestom, omejenim obsegom izbire tarčnih sekvenc za spreminjanje genoma ter pogostimi citotoksičnimi učinki. Po odkritju proteinov TALE (transkripcijskim aktivatorjem podobni efektorji) se je uporaba ZFN močno zmanjšala (Miller in sod., 2007).

3.1.2 Nukleaza TAL-efektorja

Podobno delovanje kot pri uporabi ZFN lahko zasledimo tudi pri uporabi nukleaz TAL-efektorja (ang. transcription activator-like effector nucleases ali TALEN). Strukturo teh nukleaz prav tako sestavljata DNA vezavna domena in FokI katalitična domena oz. nukleazna domena. DNA vezavne domene v tem primeru ne predstavljajo cinkovi prsti, ampak DNA vezavna domena proteinov TALE. Ti proteini izvirajo iz rastlinskega patogena, bakterije *Xanthomonas spp.* (Boch in sod., 2009). Domeno sestavlja več ponovitev iz 33-35 aminokislin, ki so visoko ohranjene, variabilnost se kaže le v dveh aminokislinah na 12. in 13. mestu. Ti dve aminokislini predstavljata mesto RVD (ang. repeat variable diresidue), ki omogoča vsaki ponovitvi, da samostojno prepozna določen nukleotid. Poznavanje kode specifičnosti RVD za posamezne nukleotide nam omogoča enostavno načrtovanje in izkoriščanje TALEN za nastanek DSB (Moscou in Bogdanove, 2009).

Glavna prednost uporabe TALEN pred ZFN so nižji stroški in večja učinkovitost. Kljub temu pa je optimizacija tarčno specifičnega delovanja te tehnike bolj zapletena kot pri tehnologiji CRISPR/Cas (Gaj in sod., 2013).

3.1.3 Tehnologija CRISPR/Cas

Najnovejša in najbolj obetajoča tehnika preurejanja genoma je tehnologija CRISPR/Cas, ki izvira iz pridobljenega imunskega sistema nekaterih bakterij in arhej. Ti mikroorganizmi imajo v svojem genomu CRISPR lokus, v katerega se vstavijo tuji segmenti DNA ali t.i.

vmesniki (ang. spacers), da lahko ob ponovnem vstopu virusne ali plazmidne DNA, le-to prepoznajo in jo uničijo (Hsu in sod., 2014). Za namen genomskega preurejanja je najbolj v uporabi modificiran CRISPR sistem tipa II (CRISPR/Cas9), ki v naravi poleg prekurzorske CRISPR RNA (pre-crRNA) vsebuje še trans-aktivirajočo crRNA (tracrRNA). TracrRNA se veže na palindromske ponovitve pre-crRNA, s čimer se formira RNA dupleks, ki ga ribonukleaza III cepi na krajše fragmente. Del crRNA, kjer je vezana tracrRNA, predstavlja vezavno mesto za nukleazo Cas9. Novonastali ribonukleoproteinski kompleks (kompleks RNP) se preko Cas9 veže na DNA, na vseh mestih, kjer je prisoten protovmesniku bližnji motiv (ang. protospacer adjacent motif ali PAM). Če med prostim delom crRNA in zaporedjem DNA, ki se nahaja v bližini mesta PAM, obstaja komplementarnost, se aktivira endonukleazna aktivnost, ki povzroči DSB. Zaporedje PAM sestavlja nekaj nukleotidov, ki predstavljajo vezavno mesto za nukleazo. S tem zaporedjem se celica zavaruje, da ne uniči lastnega CRISPR lokusa, saj zaporedja PAM na njem niso prisotna in tako niso prepoznani s strani nukleaze (Doudna in Charpentier, 2014).

Za laboratorijsko uporabo te tehnologije so znanstveniki razvili enostavnejšo obliko sistema CRISPR/Cas9, ki dve RNA molekuli (crRNA in tracrRNA) združuje v eni molekuli RNA t.i. vodilni RNA (ang. single guide RNA - sgRNA). sgRNA ohranja obe glavni funkciji crRNA/tracrRNA kompleksa - parjenje baz na specifičnem tarčnem zaporedju in vezavno domeno Cas9. S spreminjanjem zapisa 5' konca sgRNA lahko dosežemo vezavo na različna tarčna zaporedja, kar omogoča široko uporabo tehnologije CRISPR/Cas9 (Mali in sod., 2013). To predstavlja tudi glavno prednost pred ZFN in TALEN, kjer se moramo za spreminjanje vezavnega mesta posluževati proteinskega inženiringa (Doudna in Charpentier, 2014).

Preglednica 1: Primerjava različnih tipov vodenih nukleaz za genomsko preurejanje (prirejeno po Mollanoori in sod., 2018; Liu in sod., 2019).

Lastnosti	CRISPR/Cas9	TALEN	ZFN
DNA vezavna domena	RNA	Protein	Protein
Nukleaza	Cas9	FokI	FokI
Cena	Nizka	Srednje visoka	Visoka
Toksičnost	Nizka	Variabilna - visoka	Nizka
Oblikovanje sistema	Enostavno	Kompleksno	Kompleksno
Učinkovitost	Visoka	Visoka	Visoka
Sposobnost hkratnega preurejanja večih delov genoma	Visoka	Nizka	Nizka
Izventarčno delovanje	Visoko	Nizko	Nizko

3.2 DOSTAVA SISTEMOV ZA UREJANJE GENOMA V CELICE T

Opisane nukleaze običajno vstavijo v celice T z elektroporacijo, v obliki proteina, kompleksa RNP, plazmida ali mRNA zapisa. Na voljo pa so tudi druge fizikalne metode in različni vektorji (Xu in sod., 2019). V primeru uporabe DNA matrice za HDR, le-to dostavijo s pomočjo neintegrativnih virusnih vektorjev, kot so adenovirusi in adenovirusom podobni vektorji (AAV), ali ne-virusnih vektorjev (npr. lipidni vektorji in liposomi) (Kaczmarczyk in sod., 2011).

Slabost virusnih vektorjev je zahtevna priprava genskih konstruktov, manipulacija virusov, možna imunogenost in kancerogenost ter omejena kapaciteta vnosa (Wang in sod., 2016). Ne-virusni vektorji nimajo negativnih lastnosti virusov, prav tako je njihova sinteza bolj enostavna kot pri virusnih vektorjih, vendar pa je njihova slabost nižja učinkovitost dostave (Yin in sod., 2014).

Učinkovita dostava sistemov za preurejanje genoma še vedno predstavlja izziv pri ustvarjanju modificiranih terapevtskih celic (Li in sod., 2020). Nedavno so s študijo tehnologije CRISPR/Cas9 za reprogramiranje celic T prikazali učinkovit primer hkratne elektroporacije linearne donorske DNA, ki v celici služi kot predloga za HDR, in RNP kompleksa. Brez sočasne elektroporacije s kompleksom RNP je bila dolga linearna DNA za celico bolj toksična kot s hkratno elektroporacijo, s čimer so ohranili relativno visoko viabilnost celic T in hkrati dosegli učinkovito insercijo transgenov (Roth in sod., 2018). Uporaba tega in podobnih pristopov bi lahko v prihodnosti omogočila nižjo ceno produkcije modificiranih celic T, saj se tako lahko izognemo dragemu in zamudnemu ustvarjanju virusnih vektorjev. Obe lastnosti sta še posebej pomembni pri produkciji celic CAR-T v večjih količinah (Guedan in sod., 2018).

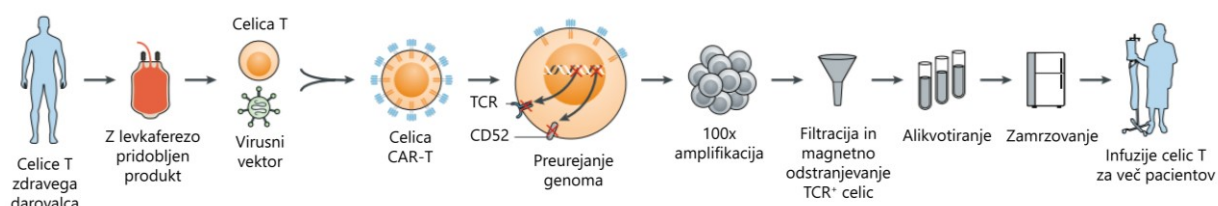
4 STRATEGIJE RAZVOJA TERAPIJ CAR-T S PREUREJANJEM GENOMA

4.1 RAZVOJ ALOGENIH CELIC CAR-T

Trenutne celične terapije CAR-T temeljijo na uporabi pacientu avtolognih celic T. To predstavlja kar nekaj omejitev za širšo uporabo terapij CAR-T. Prvo oviro predstavljajo kompleksni postopki kontrole kakovosti v njihovi proizvodnji. Ker vsakemu pacientu pripravijo celično terapijo iz njegovih lastnih celic, to pomeni, da je v produkciji prisotna vsaj majhna variabilnost, ki jo narekuje variabilnost začetne populacije celic (Singh in sod., 2016). Na uspešnost priprave učinkovitih celic CAR-T vpliva tudi predhodni režim zdravljenja posameznega pacienta. Predhodno zdravljenje lahko namreč konkretno spremeni biološke lastnosti avtolognih celic T, zaradi katerih je učinkovitost terapije lahko slabša (Salmikangas in sod., 2018). Težava priprave celic CAR-T je tudi visoka cena, ki jo zahteva personalizirani pristop (Jung in Lee, 2018). Personalizacija pa zahteva tudi dolgotrajno pripravo celic. Produkcija takšne avtologne terapije traja približno tri tedne od odvzema celic. To lahko pri

pacientih z agresivno obliko bolezni povzroči neželeno napredovanje bolezni ali celo smrt (Köhl in sod., 2018).

Oviram pri zdravljenju z avtolognimi celicami T bi se lahko izognili z razvojem alogene CAR-T celične terapije. Potencialna prednost uporabe celic T zdravih darovalcev je znižanje stroškov proizvodnje celic CAR-T, saj bi le-ta lahko potekala v večjem obsegu, zahtevala manj logističnih priprav, naenkrat pa bi lahko iz celic enega samega darovalca namnožili večjo količino celic CAR-T. Preko proizvodnje šarž in krioprezervacije celic T, bi bile terapije takoj dostopne pacientom. Pri avtologni terapiji običajno obstaja le ena priložnost odvzema vzorca celic, alogeni pristop pa omogoča natančen izbor vira celic, ki ni bil podvržen bolezni in predhodnim terapijam. Preko dolgotrajnega shranjevanja posameznih šarž bi bilo mogoče tudi večkratno odmerjanje. Potencialno bi alogena terapija lahko omogočala tudi uporabo kombinacije celic CAR-T, ki ciljajo na različne antigene (Thommen in Schumacher, 2018).



Slika 2: Proizvodnja alogenih celic CAR-T. Alogene celice CAR-T iz posamezne proizvodne šarže lahko potencialno koristijo večim pacientom. Proizvodni proces alogenih celic CAR-T se začne z levkaferezo limfocitov T zdravega darovalca. Metode kot so transgeneza z virusnim vektorjem ali genomsko preurejanje omogočajo trajno vključitev rekombinantne DNA, ki kodira zapis za CAR, in potencialno preurejanje dodatnih genov v genomu pridobljenih limfocitov. Prav tako lahko s temi metodami preprečimo izražanje $\alpha\beta$ T-celičnega receptorja in glikoproteina CD52. Celice T se nato namnožijo s pomočjo anti-CD3/anti-CD28 kroglic in citokinov. Preostale TCR⁺ celice T so odstranjene z magnetnim celičnim separatorjem preko uporabe anti- $\alpha\beta$ TCR protiteles. Sledi polnjenje vial s pridobljenimi alogenimi celicami CAR-T, shranjevanje in transport do bolnišnic (Depil in sod., 2020).

Uporaba alogenih celic je lahko nevarna, saj neujemanje v MHC med darovalcem in prejemnikom lahko privede do hudih stranskih učinkov, celo do smrti pacienta. Varno in učinkovito terapijo z alogenimi celicami CAR-T lahko zato dosežemo z utišanjem imunoloških interakcij. Pri tem si lahko pomagamo s tehnologijo genomskega preurejanja (Jung in Lee, 2018).

Preglednica 2: Trenutne klinične raziskave za razvoj terapij z alogenimi celicami CAR-T (Li in sod., 2020).

Tarča za CAR	Tehnika preurejanja genoma	Tarčni lokus za izbitje	Bolezni	Faza	Razvojna organizacija	NCT ID
CD19	TALEN	TCR in CD52	B-ALL	1	Servier Group company	NCT02808442 NCT02735083 NCT02746952
CD19	CRISPR/Cas9	TRAC in HLA-I	ALL in NHL	1/2	Shanghai Bioray Laboratory Inc.	NCT03229876
CD19	CRISPR/Cas9	TRAC in B2M	B-celična levkemija in limfom	1/2	Chinese PLA General Hospital	NCT03166878
CD19	CRISPR/Cas9	TCR in CD52	RR DLBCL	1	Nanjing Bioheng Biotech Co., Ltd	NCT04026100
CD123	TALEN	TCR in CD52	RR in novo diagnosticirana AML	1	Collectis S.A.	NCT04106076 NCT03190278
CD123	TALEN	TCR in CD52	RR BPDCN	1	Collectis S.A.	NCT03203369
BCMA	CRISPR/Cas9	TRAC in HLA-I	Diseminirani plazmocitom	1/2	Shanghai Bioray Laboratory Inc.	NCT03752541

Legenda: NHL, ne-Hodgkinov limfom; RR, refraktoren ali rekurenten; DLBCL, difuzni velikocelični limfom B; AML, akutna mieloična levkemija; BPDCN, novotvorba blastnih plazmacitoidnih dendritičnih celic; NCT ID, identifikacijska številka klinične raziskave; faza 1, korak preizkušanja zdravila, primarno namenjen preverjanju varnosti na najmanjšem številu pacientov; faza 1/2, korak preizkušanja zdravila, ki združuje fazo 1 (varnost) in 2 (učinkovitost), z namenom pridobitve rezultatov v krajšem času ali na manjšem številu pacientov.

4.1.1 Bolezen presadka proti gostitelju

Glavni učinek, ki ga želimo preprečiti, je bolezen presadka proti gostitelju (ang. graft versus host disease ali GvHD). Gre za citotoksični učinek darovanih celic T, ki z izražanjem faktorjev tumorske nekroze in sprostitve vsebine intracelularnih granul (vsebujejo perforine, grancime) poškodujejo gostiteljevo oz. prejemnikovo tkivo. GvHD predstavlja glavni vzrok smrti pri transplantacijah krvotvornih matičnih celic. S študijami te terapije si zato lahko pomagamo pri razvoju varnih alogeni CAR-T celičnih terapij. Predhodne študije so pokazale, da igrajo $\alpha\beta$ celice T glavno vlogo pri pojavu GvHD. Njihovi T-celični receptorji namreč prepoznavajo peptide predstavljene v MHC, ki ga pri ljudeh imenujemo tudi humani levkocitni antigen (ang. human leukocyte antigen ali HLA). V primeru interakcije TCR s sebi nelastnim MHC kompleksom, se aktivira imunski odziv darovanih celic proti gostiteljevemu tkivu. MHC lokus je najbolj polimorfen del človeškega genoma, vsak posameznik pa izraža le nekaj variant MHC, zato je takšen odziv pri uporabi alogeni celic skoraj neizogiben (Felix in Allen, 2007).

TCR kompleks $\alpha\beta$ celic T je sestavljen iz α in β verige, sodeluje pa s ko-receptorjem CD3. Za razliko od β verige, ki ima zapis za dve možni konstantni regiji, ima zapis za α verigo le eno

možno različico. Najenostavnejši pristop za pridobivanje celic brez endogenih TCR je torej prekinitev gena, ki kodira konstantno regijo α verige (TRAC lokus). Prva študija, ki je preučevala izvedljivost izbijanja (ang. knockout ali KO) TRAC lokusa v celicah CAR-T, je med drugim pokazala, da izbitje tega gena s tehniko ZFN ne vpliva na protitumorske lastnosti (Torikai in sod., 2012). Poirot in sod. (2015) so z elektroporacijo dveh različnih TALEN dokazali možnost uporabe te tehnologije pri ciljanju več regij v genomu. V tem primeru so proizvedli celice T, ki niso izražale TCR in glikoproteina CD52. Rezultati uporabe teh celic na mišjih modelih so pokazali odsotnost GvHD in odpornost mišk na anti-CD52 monoklonska protitelesa (alemtuzumab), ki se uporabljajo za zmanjšanje števila prisotnih celic T prejemnika (izražajo CD52), ki bi lahko napadle donorske celice. Takšen pristop hkratne indukcije DSB na več mestih genoma pa prinese tveganja za nastanek neželenih translokacij (Poirot in sod., 2015).

Konvencionalni pristopi priprave celic CAR-T uporabljajo virusne vektorje, kjer prihaja do naključne integracije zapisa CAR. Eyquem in sod. (2017) so razvili strategijo uporabe tehnologije CRISPR/Cas9 za integracijo zapisa CAR v lokus TRAC. Takšna integracija ponuja kar nekaj potencialnih prednosti pred naključno integracijo. Z enim samim korakom lahko inaktiviramo izražanje TCR in uvedemo zapis za ekspresijo CAR, stranskih učinkov je manj, saj ni prisotnih mutacij, ki so povezane z integracijo na naključna mesta v genomu, dosežemo pa regulacijo izražanja CAR preko endogenega promotorja TCR. Izražanje TCR je namreč odvisno od prisotnosti antigenov, to lastnost pa želimo imeti tudi pri izražanju CAR. Omogoča nam zaščito pred pretirano aktivacijo celic T, ki lahko vodi v T-celično diferenciacijo in izčrpanost. Omenjena študija je na mišjem modelu akutne limfoblastne levkemije pokazala boljšo protitumorsko učinkovitost TRAC-CD19 celic CAR-T kot celic CAR-T ustvarjenih z retrovirusno transdukcijo (Eyquem in sod., 2017).

Poleg genomskega preurejanja Depil in sod. (2020) povzemajo še druge potencialne pristope za zmanjšanje tveganja pojava GvHD: uporaba drugih citotoksičnih imunskih celic za CAR nosilce (npr. naravne celice ubijalke), uporaba virusno-specifičnih spominskih celic T ter uporaba alogenih celic CAR-T, pridobljenih od istega darovalca, kot so bile v preteklosti pridobljene krvotvorne matične celice (le za paciente, ki so prehodno prejeli takšno transplantacijo).

4.1.2 Učinek gostitelja proti presadku

Druga težava, ki jo še moramo rešiti pred potencialno uporabo alogenih celic, je zavrnitev celic CAR-T s strani prejemnika ali t.i. učinek gostitelja proti presadku (ang. host versus graft effect ali HvG). Ta učinek sicer ni usmerjen direktno proti prejemniku terapije, vendar onemogoča ustrezno delovanje terapije CAR-T. Enostaven pristop za reševanje te težave je uporaba imunosupresivnih sredstev, ki med CAR-T terapijo onemogočajo delovanje lastnih, nemodificiranih celic T. Edina ovira pri tem je, da ta sredstva delujejo tudi na celice CAR-T (Jung in Lee, 2018). Kot že omenjeno, so Poirot in sod. (2015) v ta namen s pomočjo

preurejanja genoma ustvarili CAR-T celice, ki na svoji površini ne izražajo molekul na katere delujejo specifični imunosupresivi (v tem primeru anti-CD52 protitelesa).

4.2 RAZŠIRITEV SPEKTRA POTENCIALNIH TARČNIH ANTIGENOV

Danes lahko s terapijami CAR-T zdravimo omejeno število oblik krvnega raka. Razlog za to je v pomankanju poznanih tumorskih antigenov, proti katerim bi lahko ustvarili celice CAR-T. Izbrani antigen mora zadovoljiti dva pogoja: antigen mora biti izražen na vseh tumorskih celicah, obenem pa ta antigen ne sme biti prisoten na zdravih celicah. Iskanje ustreznih antigenov je pogosto neuspešno, saj večinoma niso tumorsko specifični (Chen in sod. (2017)).

Pri zdravljenju T-celičnih malignosti se uporabljajo celice CAR-T usmerjene proti različnim antigenom. Mednje sodijo tudi proteini CD4, CD5 in CD7, ki so pogosto izraženi na površini malignih celic T. Nekatere študije so pokazale, da ciljanje teh antigenov lahko privede do samouničevalnega pojava, saj lahko tudi celice CAR-T na svoji površini izražajo našteje proteine. Celokupna količina celic T je zato tekom terapij močno upadla zaradi samodestruktivnega delovanja celic CAR-T, saj so nekatere izražale enake antigene (CD4, CD5 ali CD7) kot maligne celice. S tem se je zmanjšala učinkovitost terapije (Chen in sod., 2017).

Chen in sod. (2017) so se temu pojavu izognili z uporabo alternativnih celic za izražanje CAR. V svoji študiji so razvili anti-CD5 CAR naravne celice ubijalke (ang. natural killer cells). Ker naravne celice ubijalke na svoji površini ne izražajo CD5, ni prišlo do samodestruktivnega delovanja. Kljub tej zanimivi rešitvi, se iščejo nove strategije, ki bi omogočile boljše izkoriščanje terapevtskega potenciala celic T (Jung in Lee, 2018).

Cooper in sod. (2018) so na primer uporabili posebno strategijo, v kateri so celicam CAR-T onemogočili izražanje CD7. To so dosegli s KO gena za CD7 s pomočjo tehnologije CRISP/Cas9. Podoben pristop so uporabili tudi Galetto in sod. (2015), ki so za tarčni antigen celic CAR-T izbrali CS1, antigen značilen za celice diseminiranega plazmocitoma. Za izvedbo KO gena za CS1 so uporabili TALEN.

4.3 RAZVOJ CELIC CAR-T Z BOLJŠO UČINKOVITOSTJO PROTITUMORSKEGA DELOVANJA

Kljub uspehom pri zdravljenju B-celičnih malignosti, učinkovitega zdravljenja tumorjev trdnih tkiv s celicami CAR-T še nismo dosegli. Ena od glavnih težav je dostava in razporeditev celic CAR-T po trdnih tkivih. Neučinkovito delovanje celic CAR-T proti tumorjem trdnih tkiv pripisujejo tudi številnim imunosupresivnim mehanizmom, ki so prisotni v mikrookolju tumorja. Glavni namen teh mehanizmov je reprogramiranje celic CAR-T v fazo izčrpanosti (ang. T cell exhaustion), kjer izgubijo efektorsko funkcijo (Davenport in sod., 2015).

Prva strategija, ki deloma rešuje problem imunosupresivnih mehanizmov, je izražanje CAR pod močnimi, konstitutivnimi promotorji, kot sta EF1 α in LTR. Takšna nekontrolirana ekspresija CAR pa lahko vodi v pospešeno T-celično diferenciacijo in izgubo protitumorskega delovanja, zato so Eyquem in sod. (2017) prikazali že opisano strategijo vključitve CAR gena v lokus TRAC.

Aktivnost celic CAR-T je lahko v mikrookolju tumorja zmanjšana tudi zaradi imunosupresivnih mehanizmov, ki se aktivirajo preko inhibitornih molekul, izraženih na celicah T (npr. PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3). Te molekule v normalnih pogojih zagotavljajo ustrezno kontrolo oz. potencialno inhibicijo T-celičnega odziva in preprečujejo pojav nenadzorovanega vnetja ali avtoimunskega odziva. Nedavne raziskave so pokazale, da te imunosupresivne mehanizme izkoriščajo tudi tumorske celice. Z izražanjem ligandov kot je ligand PD-1 inducirajo inhibitorne signale v celicah T (Wherry in Kurachi, 2015). Preko odkritja tega mehanizma so bile razvite zdravilne učinkovine, ki zavirajo omenjene inhibitorne signale. Običajno gre za protitelesa usmerjena proti inhibitornim receptorjem (npr. anti-PD-1), imenujemo jih zaviralci kontrolnih točk (ang. checkpoint blockade). Poleg boljšega protitumorskega delovanja žal takšne zdravilne učinkovine pogosto povzročajo tudi neželene stranske učinke, kot je avtoimunski odziv (Naidoo in sod., 2015). Za reševanje tega problema so že bile preizkušene strategije z uporabo tehnologij preurejanja genoma. Najbolj priljubljena je KO receptorja PD-1, s katero so v mišjih modelih pokazali večjo protitumorsko učinkovitost celic CAR-T, tako pri krvnih kot tudi raki trdnih tkiv (Rupp in sod., 2017).

Še ena obetajoča strategija je KO receptorja Fas v celicah CAR-T. FasL je še ena molekula, ki jo lahko najdemo v mikrookolju tumorja, kjer spodbuja apoptozo citotoksičnih celic T in njihovo terminalno diferenciacijo. Preko tega učinka je seveda zmanjšano tudi protitumorsko delovanje celic CAR-T, KO receptorja pa ta učinek prepreči (Ren in sod., 2017). Ren in sod. (2017) so to strategijo združili še s KO TRAC in PD-1. Z dostavo treh sgRNA preko lentivirusnega vektorja in Cas9 mRNA so pokazali spodbudne rezultate uporabe CRISPR/Cas9 za preurejanje več lokusov v celicah CAR-T hkrati. Podobne učinke je možno doseči tudi s KO drugih molekul, ki predstavljajo kontrolne točke imunskega odziva (Jung in Lee, 2018).

Za razvoj učinkovitih terapij za zdravljenje tumorjev trdnih tkiv s celicami CAR-T bodo potrebne nove strategije, s katerimi bo zagotovljena ustrezna migracija celic CAR-T do malignega tkiva in razporeditev po njem. Dodaten izziv predstavlja že prej omenjeno iskanje ustreznih tarčnih antigenov, saj je za tumorje trdnih tkiv značilna izrazita heterogenost celičnih karakteristik (DeRenzo in Gottschalk, 2019).

5 OMEJITVE UPORABE TEHNIK PREUREJANJA GENOMA IN MOŽNE REŠITVE

Čeprav ni dvoma, da lahko sodobne tehnike genomskega preurejanja izboljšajo učinkovitost CAR-T celičnih terapij, ima njihova uporaba še vedno kar nekaj tehničnih in varnostnih omejitev (Jung in Lee, 2018).

5.1 IZVENTARČNI UČINKI

Glavno varnostno skrb predstavljajo izventarčni učinki (ang. off-target effects), ki so posledica inducirane mutageneze na neželenih mestih. Učinki takšne mutageneze so lahko bolj ali manj destruktivni za celico, med drugim pa lahko povzročijo inaktivacijo tumorsupresorskih genov ali aktivacijo onkogenov (Jung in Lee, 2018). Kljub temu, da velja delovanje vodenih nukleaz za tarčno, interakcije z DNA niso visoko specifične, zato lahko nastanejo prelomi DNA tudi na izventarčnih mestih. Ta pojav je najpogostejši pri CRISPR/Cas9, kjer je možna vezava RNP kompleksa na DNA tudi ob nepopolnem ujemanju zaporedij ali pa na drugih mestih, kjer je zaporedje podobno tarčnemu. To predstavlja glavno oviro pri uporabi CRISPR/Cas9 za terapevtske namene, saj lahko vodi do neželenih mutacij ali celo v kromosomske preureditve (Mollanoori in sod., 2018). Zato se iščejo rešitve, ki bi zmanjšale ali odpravile prisotnost izventarčnih učinkov.

Prva potencialna izboljšava bi lahko bila optimalna selekcija sgRNA. Raziskovalci si pri tem pomagajo z bioinformacijskimi orodji, ki predvidijo interakcije vezavnih domen nukleaznih kompleksov s tarčno DNA. To jim omogoča načrtovanje sgRNA z maksimalno specifičnostjo vezave na željeni lokus (Chira in sod., 2017). Fu in sod. (2014) poročajo tudi o možni uporabi okrnjenih sgRNA. Del 5' konca sgRNA namreč ni nujen za popolno aktivnost, hkrati pa dovoljuje nepopolna ujemanja zaporedij. Z razvojem sgRNA brez tega dela so pridobili večjo občutljivost na neujemanja in s tem zmanjšali pojavnost izventarčnih učinkov. Ob primerjavi uporabe krajših sgRNA z običajnimi so pokazali, da se učinkovitost metode ni zmanjšala.

Za specifično delovanje tehnologije CRISPR/Cas9 ni odgovorna le sgRNA, temveč tudi komplementarnost proteina Cas9 z zaporedjem PAM. Pogoj prisotnosti ustreznega PAM zaporedja na tarčnem mestu, poleg zagotavljanja specifičnosti metode, predstavlja tudi omejitev, predvsem pri preurejanju krajših zaporedij, kjer je verjetnost prisotnosti ustreznega zaporedja PAM majhna. Tako je danes že možno ustvarjane modificiranih proteinov Cas9 s spremenjeno preferenco za PAM zaporedje. S to rešitvijo se lahko doseže širši spekter delovanja, hkrati pa nadgradi specifičnost vezave sgRNA (Kleinstiver in sod., 2015).

Razvoj novih proteinov Cas9 je omogočilo tudi proučevanje kristalne strukture kompleksa Cas9/sgRNA vezanega na tarčno DNA (Kleinstiver in sod., 2016). Kleinstiver in sod. (2016) so z zamenjavami večih aminokislin, ki se vežejo na fosfatno ogrodje tarčne DNA, ustvarili visoko specifičen Cas9 (ang. high fidelity Cas9). Ta varianta Cas9 proteina je pokazala manj

izventarčne aktivnosti. Princip takšnega delovanja temelji na dejstvu, da so nekatere interakcije Cas9 z DNA nespecifične. Modifikacije teh delov lahko tako zmanjšajo vezavno energijo Cas9/sgRNA kompleksa in s tem onemogočijo pojav nespecifičnih vezav.

Še en možen pristop modifikacije proteinov Cas9 za zmanjšanje izventarčnega delovanja je uporaba nikaz Cas9 (ang. Cas9 nickases ali nCas9). Gre za Cas9 proteine proizvedene z induciranjem mutacij v eni izmed dveh nukleaznih domen, HNH ali RuvC. Strategija takšnega modificiranja je ustvarjanje posebnih proteinov Cas9, torej nCas9, ki niso več sposobni povzročati DSB, ampak cepijo le eno verigo tarčne DNA. DSB tako nastane le ob delovanju para nCas9, podobno kot delujeta ZFN in TALEN, s tem pa lahko podvojimo specifičnost ustvarjanja DSB s tehnologijo CRISPR/Cas (Ran in sod., 2013). Protein Cas9 pa lahko tudi popolnoma izgubi sposobnost cepitve, in sicer, kadar ustvarimo mutacije v obeh nukleaznih domenah. Takrat govorimo o mrtvem Cas9 (ang. dead Cas9 ali dCas9), ki ga prav tako lahko izrabimo za doseganje tarčnih DSB. S fuzijo proteina dCas9 z nespecifično nukleazno domeno FokI lahko ustvarimo posebno tehniko vodene nukleaze, ki omogoča še večjo točnost preurejanja genoma, saj je za aktivnost FokI potrebna dimerizacija. Dimerizacija v tem primeru pomeni, da je za ustvarjanje DSB potrebno prileganje dveh sgRNA, tako kot pri uporabi nikaz Cas9 (Wyvekens in sod., 2015).

Z izventarčnim delovanjem so povezali tudi daljše čase izpostavitve genoma delovanju Cas9 in njegovim večjim količinam. Iz tega izhajajo strategije, ki želijo s kontrolo aktivnosti Cas9 doseči manj izventarčnih učinkov. Primera teh strategij sta izražanje Cas9 pod regulacijo inducibilnega promotorja, fuzija Cas9 s fotosenzitivnimi elementi, ki bi inducirali aktivnost ob prisotnosti modre svetlobe, ... (Chira in sod., 2017).

5.2 DRUGE OMEJITVE

Nevarnost predstavljajo tudi translokacije fragmentov med posameznimi mesti DSB, ki lahko nastanejo ob hkratnem preurejanju večih delov genoma. Poirot in sod. (2015) so pri uporabi TALEN za hkratno ciljanje TRAC in CD52 lokusov zasledili pojav translokacij pri stopnji $1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-2}$. Čeprav sprememb v proliferaciji teh celic niso zaznali, so potrebne analitske metode, ki bodo zagotovile varnost uporabe te tehnologije.

V preteklosti je bilo modificiranje primarnih T-celičnih linij neizvedljivo zaradi nizke učinkovitosti transfekcije. Velik napredek pri razvoju teh metod pa nam je skupaj z učinkovitimi metodami aktivacije omogočil, da nam danes modifikacije genoma primarnih celic T ne predstavljajo več večje ovire. Kljub temu lahko njihov nadaljnji razvoj še izboljša učinkovitost tehnik genomskega preurejanja, omogoči vključevanje daljših fragmentov ter zniža ceno končne terapije (Jung in Lee, 2018).

Drugi izziv priprave celic je relativno nizka učinkovitost vstavljanja zaporedij (ang. knockin ali KI), v primerjavi z izbijanjem genov, ki dosega 70-90 % učinkovitost. Utišanje delovanja

proteina p53 med genomskim preurejanjem pigmentnih epitelnih celic mrežnice in humanih pluripotentnih matičnih celic je pokazalo porast homolognih rekombinacij, kot popravljalnega mehanizma, ki lahko rezultira v KI, v primerjavi z genomskim preurejanjem istih celic brez utišanega p53. Protein p53 sodeluje v popravljalnih mehanizmih molekule DNA in aktivaciji apoptoze celice v primeru neuspešnosti teh mehanizmov, kar pojasni njegovo prisotnost ob indukciji DSB s tehnikami genomskega preurejanja. Vpliv utišanja p53 na učinkovitost KI še ni bil dokazan pri preurejanju genoma humanih primarnih celic T (Haapaniemi in sod., 2018).

Poleg optimizacije priprave celic CAR-T je izredno pomembno tudi ugotavljanje neželenih učinkov teh celic v klinični uporabi. V več študijah uporabe celic CAR-T, usmerjenih proti tumorskem antigenu CD19, so opazili pojav resnih sistemskih vnetnih odzivov kot je sindrom prekomernega izločanja citokinov. Ti odzivi so posledica spodbujene hiperproliferacije in delovanja celic CAR-T z izničnim genom za PD-1, zato bo potrebno varnostne vidike njihove klinične uporabe še bolj temeljito preučiti (Lee in sod., 2015; Porter in sod., 2015).

6 ZAKLJUČEK

Rak je bolezen, ki v sodobnem svetu predstavlja enega najpogostejših vzrokov smrti. S staranjem prebivalstva je težnja po iskanju novih, boljših oblik zdravljenja raka vse večja. Za pomemben dosežek sodobne medicine lahko štejemo razvoj celične terapije CAR-T. Ta trenutno omogoča zdravljenje nekaterih hudih oblik levkemij, a hkrati kaže velik potencial za širšo uporabo v prihodnosti.

Glavni izzivi razvoja terapij CAR-T se nanašajo na varnost pristopa, učinkovitost in zmanjšanje stroškov proizvodnje celic CAR-T. Z novimi rešitvami bi lahko dosegli širšo uporabnost celic CAR-T, tako z vidika cenovne dostopnosti, kot tudi primernosti terapije za zdravljenje drugih indikacij. Ena izmed strategij reševanja omenjenih izzivov je uporaba tehnik za preurejanje genoma. Mednje štejemo uporabo vodenih nukleaz kot so ZFN, TALEN in sistem CRISPR/Cas9. Preurejanje genoma celic T z namenom razvoja alogeničnih terapij CAR-T, uporabe širšega spektra potencialnih tarčnih antigenov in celic CAR-T z boljšo protitumorsko učinkovitostjo že poteka. Glavna omejitev uporabe tehnik preurejanja genoma celic T za klinično uporabo so potencialni izventarčni učinki, ki lahko povzročijo mutagenozo na neželenih mestih v genomu.

Kljub hitremu napredku tehnik genomskega preurejanja bo potrebno v razvoj učinkovitejših terapij CAR-T vključiti še druge strategije kot so optimizacija CAR konstrukta, identifikacija novih tumor-specifičnih antigenov, optimizacija dostave celic CAR-T do malignih tkiv in optimizacija terapij, ki potekajo pred oz. med terapijo s celicami CAR-T. Verjamemo lahko, da bo tak pristop omogočil uporabo terapije CAR-T tudi za zdravljenje drugih obolenj, ne le levkemij.

7 VIRI

- Benmebarek M. R., Karches C. H., Cadilha B. L., Lesch S., Endres S., Kobold S. 2019. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6: 1283, doi: 10.3390/ijms20061283: 21 str.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, 5959: 1509–1512
- Chen K. H., Wada M., Pinz K. G., Liu H., Lin K. W., Jares A., Firor A. E., Shuai X., Salman H., Golightly M., Lan F., Senzel L., Leung E. L., Jiang X., Ma Y. 2017. Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor. *Leukemia*, 31, 10: 2151-2160
- Chira S., Gulei D., Hajitou A., Zimta A. A., Cordelier P., Berindan-Neagoe I. 2017. CRISPR/Cas9: Transcending the reality of genome editing. *Molecular Therapy, Nucleic acids*, 7: 211–222
- Cooper M. L., Choi J., Staser K., Ritchey J. K., Devenport J. M., Eckardt K., Rettig M. P., Wang B., Eissenberg L. G., Ghobadi A., Gehrs L. N., Prior J. L., Achilefu S., Miller C. A., Fronick C. C., O'Neal J., Gao F., Weinstock D. M., Gutierrez A., Fulton R. S., DiPersio J. F. 2018. An "off-the-shelf" fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*, 32, 9: 1970-1983
- Davenport A. J., Jenkins M. R., Ritchie D. S., Prince H. M., Trapani J. A., Kershaw M. H., Darcy P. K., Neeson P. J. 2015. CAR-T cells are serial killers. *Oncoimmunology*, 4, 12: e1053684, doi: 10.1080/2162402X.2015.1053684: 2 str.
- Depil S., Duchateau P., Grupp S. A., Mufti G., Poirot L. 2020. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nature Reviews*, 19, 22: 1-15
- DeRenzo C., Gottschalk S. 2019. Genetic Modification Strategies to Enhance CAR T Cell Persistence for patients with solid tumors. *Frontiers in Immunology*, 10: 218, doi: 10.3389/fimmu.2019.00218: 8 str.
- Doudna J. A., Charpentier E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 6213: 1258096, doi: 10.1126/science.1258096: 10 str.
- Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T., Van der Stegen S. J. C., Hamieh M., Cunanan K. M., Odak A., Gönen M., Sadelain M. 2017. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 543, 7643: 113-117
- Felix N. J., Allen P. M. 2007. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nature Reviews Immunology*, 7, 12: 942-953
- Fu Y., Sander J., Reyon D., Cascio V. M., Joung J. K. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32, 3: 279–284

- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31, 7: 397–405
- Galetto R., Chion-Sotinel I., Gouble A., Smith J. 2015. Bypassing the constraint for chimeric antigen receptor (CAR) development in T-cells expressing the targeted antigen: improvement of anti-CS1 CAR activity in allogenic TCRA/CS1 double knockout T-cells for the treatment of multiple myeloma (MM). *Blood*, 126, 23: 116, doi: 10.1182/blood.V126.23.116.116: 1 str.
- Gao Q., Dong X., Xu Q., Zhu L., Wang F., Hou Y., Chao C. C. 2019. Therapeutic potential of CRISPR/Cas9 gene editing in engineered T-cell therapy. *Cancer Medicine*, 8, 9: 4254–4264
- Guedan S., Calderon H., Posey A. D. Jr., Maus M. V. 2018. Engineering and design of chimeric antigen receptors. *Molecular Therapy*, 12: 145-156
- Haapaniemi E., Botla S., Persson J., Schmierer B., Taipale J. 2018. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*, 24, 7: 927-930
- Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157, 6: 1262–1278
- Jung IY., Lee J. 2018. Unleashing the therapeutic potential of CAR-T cell therapy using gene-editing technologies. *Molecules and Cells*, 41, 8: 717-723
- Kaczmarczyk S. J., Sitaraman K., Young H. A., Hughes S. H., Chatterjee D. K. 2011. Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 41: 16998–17003
- Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 3: 1156–1160
- Kleinstiver B. P., Prew M., Tsai S., Topkar V. V., Nguyen N. T., Zheng Z., Gonzales A. P., Li Z., Peterson R. T., Yeh J. R., Aryee M. J., Joung J. K. 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523, 7561: 481–485
- Kleinstiver B. P., Pattanayak V., Prew M. S., Tsai S. Q., Nguyen N. T., Zheng Z., Joung J. K. 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529, 7587: 490–495.
- Köhl U., Arsenieva S., Holzinger A., Abken H. 2018. CAR T Cells in Trials: Recent achievements and challenges that remain in the production of modified T cells for clinical applications. *Human Gene Therapy*, 29, 5: 559-568
- Lee D. W., Kochenderfer J. N., Stetler-Stevenson M., Cui Y. K., Delbrook C., Feldman S. A., Fry T. J., Orentas R., Sabatino M., Shah N. N., Steinberg S. M., Stroncek D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S. A., Wayne A. S., Mackall C. L. 2015. T cells

- expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 385, 9967: 517–528
- Li C., Mei H., Hu Y. 2020. Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy. *Briefings in Functional Genomics*, 19, 3: 175–182
- Liu J., Zhou G., Zhang L., Zhao Q. 2019. Building potent chimeric antigen receptor T Cells with CRISPR genome editing. *Frontiers in Immunology*, 10: 456, doi: 10.3389/fimmu.2019.00456: 8 str.
- Maeder M. L., Gersbach C. A. 2016. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy*, 24, 3: 430-446
- Maldini C. R., Ellis G. I., Riley J. L. 2018. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nature Reviews. Immunology*, 18, 10: 605–616
- Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 6121: 823–826
- 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. 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25, 7: 778–785
- Mollanoori H., Shahraki H., Rahmati Y., Teimourian S. 2018. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human Immunology*, 79, 12: 876-882
- Moscou M. J., Bogdanove A. J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326, 5959: 1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>: 1 str.
- Naidoo J., Page D. B., Li B. T., Connell L. C., Schindler K., Lacouture M. E., Postow M. A., Wolchok J. D. 2015. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Annals of Oncology*, 26, 12: 2375-2391
- Poirot L., Philip B., Schiffer-Mannioui C., Le Clerre D., Chion-Sotinel I., Derniame S., Potrel P., Bas C., Lemaire L., Galetto R., Lebuhotel C., Eyquem J., Weng-Kit Cheung G., Duclert A., Gouble A., Arnould S., Peggs K., Pule M., Scharenberg A. M., Smith J. 2015. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for "off-the-shelf" adoptive T-cell immunotherapies. *Cancer Research*, 75, 18: 3853-3864
- Porter D. L., Hwang W. T., Frey N. V., Lacey S. F., Shaw P. A., Loren A. W., Bagg A., Marcucci K. T., Shen A., Gonzalez V., Ambrose D., Grupp S. A., Chew A., Zheng Z., Milone M. C., Levine B. L., Melenhorst J. J., June C. H. 2015. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science Translational Medicine*, 7, 303: 303ra139, doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415: 25 str.

- Porteus M. H., Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 23, 8: 967-973
- Ran F. A., Hsu P. D., Lin C. Y., Gootenberg J. S., Konermann S., Trevino A. E., Scott D. A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154, 6: 1380–1389
- Ren J., Zhang X., Liu X., Fang C., Jiang S., June C. H., Zhao Y. 2017. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*, 8, 10: 17002-17011
- Roth T. L., Puig-Saus C., Yu R., Shifrut E., Carnevale J., Li P. J., Hiatt J., Saco J., Krystofinski P., Li H., Tobin V., Nguyen D. N., Lee M. R., Putnam A. L., Ferris A. L., Chen J. W., Schickel J. N., Pellerin L., Carmody D., Alkorta-Aranburu G., Del Gaudio D., Matsumoto H., Morell M., Mao Y., Cho M., Quadros R. M., Gurumurthy C. B., Smith B., Haugwitz M., Hughes S. H., Weissman J. S., Schumann K., Esensten J. H., May A. P., Ashworth A., Kupfer G. M., S. A. W. Bacchetta R., Meffre E., Grazia Roncarolo M., Romberg N., Herold K. C., Ribas A., Leonetti M. D., Marson A. 2018. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature*, 559, 7714: 405–409
- Rupp L. J., Schumann K., Roybal K. T., Gate R. E., Ye C. J., Lim W. A., Marson A. 2017. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific Reports*, 7, 1: 737, doi: 10.1038/s41598-017-00462-8: 10 str.
- Salmikangas P., Kinsella N., Chamberlain P. 2018. Chimeric antigen receptor T-cells (CAR T-cells) for cancer immunotherapy - Moving target for industry?. *Pharmaceutical Research*, 35, 8: 152, doi:10.1007/s11095-018-2436-z: 8 str.
- Singh N., Perazzelli J., Grupp S. A., Barrett D. M. 2016. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies. *Science Translational Medicine*, 8, 320: 320ra3, doi:10.1126/scitranslmed.aad5222: 9 str.
- Takata M., Sasaki M. S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 17, 18: 5497-5508
- Thommen D. S., Schumacher T. N. 2018. T cell dysfunction in cancer. *Cancer Cell*, 33, 4: 547-562
- Torikai H., Reik A., Liu P. Q., Zhou Y., Zhang L., Maiti S., Huls H., Miller J. C., Kebriaei P., Rabinovich B., Lee D. A., Champlin R. E., Bonini C., Naldini L., Rebar E. J., Gregory P. D., Holmes M. C., Cooper L. J. N. 2012. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*, 119, 24: 5697-5705

- Vormittag P., Gunn R., Ghorashian S., Veraitch F. 2018. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current Opinion in Biotechnology*, 53: 164-181
- Wang L., Li F., Dang L., Liang C., Wang C., He B., Liu J., Li D., Wu X., Xu X., Lu A., Zhang G. 2016. In vivo delivery systems for therapeutic genome editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 5: 626, doi:10.3390/ijms17050626: 19 str.
- Wherry E., Kurachi M. 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15, 8: 486–499
- Wyvekens N., Topkar V. V., Khayter C., Joung J. K., Tsai S. Q. 2015. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Human Gene Therapy*, 26, 7: 425-431.
- Xu X., Wan T., Xin H., Li D., Pan H., Wu J., Ping Y. 2019. Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing. *The Journal of Gene Medicine*, 21, 7: e3107, doi: 10.1002/jgm.3107: 18 str.
- Yin H., Kanasty R. L., Eltoukhy A. A., Vegas A. J., Dorkin J. R., Anderson D. G. 2014. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 15, 8: 541–555
- Zhang C., Liu J., Zhong J. F., Zhang X. 2017. Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research*, 5: 22, doi:10.1186/s40364-017-0102-y: 6 str.