

Statusartikel

CRISPR/Cas-geneditering af humane stamceller til kurativ behandling af primær immundefekt

Rasmus O Bak^{1, 2}, Mette Holm^{2, 3}, Bjarne Møller^{2, 4}, Jacob Giehm Mikkelsen^{1, 2} & Trine H. Mogensen^{1, 2, 5}

1) Institut for Biomedicin, Aarhus Universitet, 2) PASCAL-MID, Aarhus Universitet & Aarhus Universitetshospital, 3) Børn og Unge, Aarhus Universitetshospital, 4) Blodbank og Immunologi, Aarhus Universitetshospital, 5) Infektionssygdomme, Aarhus Universitetshospital

HOVEDBUDSKABER

Primære immundefekter (PID) er monogene sygdomme, der involverer infektion, autoimmunitet, autoinflammation og kræft.

CRISPR/Cas-geneditering har et stort potentiale inden for personlig medicin til kurativ behandling.

Der resterer teknologiske, regulatoriske og sikkerhedsmæssige udfordringer for klinisk implementering.

Primære immundefekter (PID) er oftest monogene arvelige sygdomme, som manifesterer sig med sygdom relateret til immundysregulering (derfor også benævnt inborn errors of immunity) med varierende grader af øget infektionstendens, autoimmunitet, autoinflammation, allergi og øget malignitetsrisiko. Symptombilledet afhænger af den genetiske defekt, og der er nu beskrevet mere end 500 individuelle sygdomme [1]. PID er således en heterogen gruppe af sjældne, arvelige tilstande forårsaget af genvarianter, der påvirker proteiner involveret i det innate og/eller det adaptive immunforsvar. Varianterne nedarves på forskellig vis og udviser ikke altid fuld klinisk penetrans. Defekterne kan involvere bestemte typer immunceller, receptorer, intracellulære signalmolekyler, transkriptionsfaktorer, cytokiner eller cellulære funktioner. Sygdommene forekommer hos 75% i barnealderen [2], men kan også debutere i voksenlivet med infektionstendens eller immundysregulering. Hyppigheden af PID er ukendt, men skønnes at være mellem 1/10.000 og 1/50.000. Dette tal er dog formentlig et underestimat, og efter screening af nyfødte ved hælblodprøve og implementering af helgenomsekventering i klinisk diagnostik vurderes frekvensen for svær kombineret immundefekt (SCID) alene at være 1/60.000 levendefødte børn [1]. Sygdommene er forbundet med en betydelig morbiditet og mortalitet, hvorfor kurativ behandling er et behandlingsmål. Ud over forebyggende tiltag med vaccination, antimikrobiel profylakse, immunglobulinsubstitution eller biologisk immunmodulerende terapi, er kurativ behandling for SCID og andre alvorlige PID hæmatopoietisk stamcelletransplantation (HSCT). Behandling kan med en acceptabel human leukocyt antigen (HLA)-kompatibel donor give livslang immunrekonstitution hos ca. 90% af patienter men med en mindre risiko for immunologiske komplikationer herunder graft-versus-host (GVHD)-sygdom og livstruende infektioner.

Genterapi

Et alternativ til HSCT er genterapi af patientens egne hæmatopoietiske stamceller. Her undgås brug af allogen

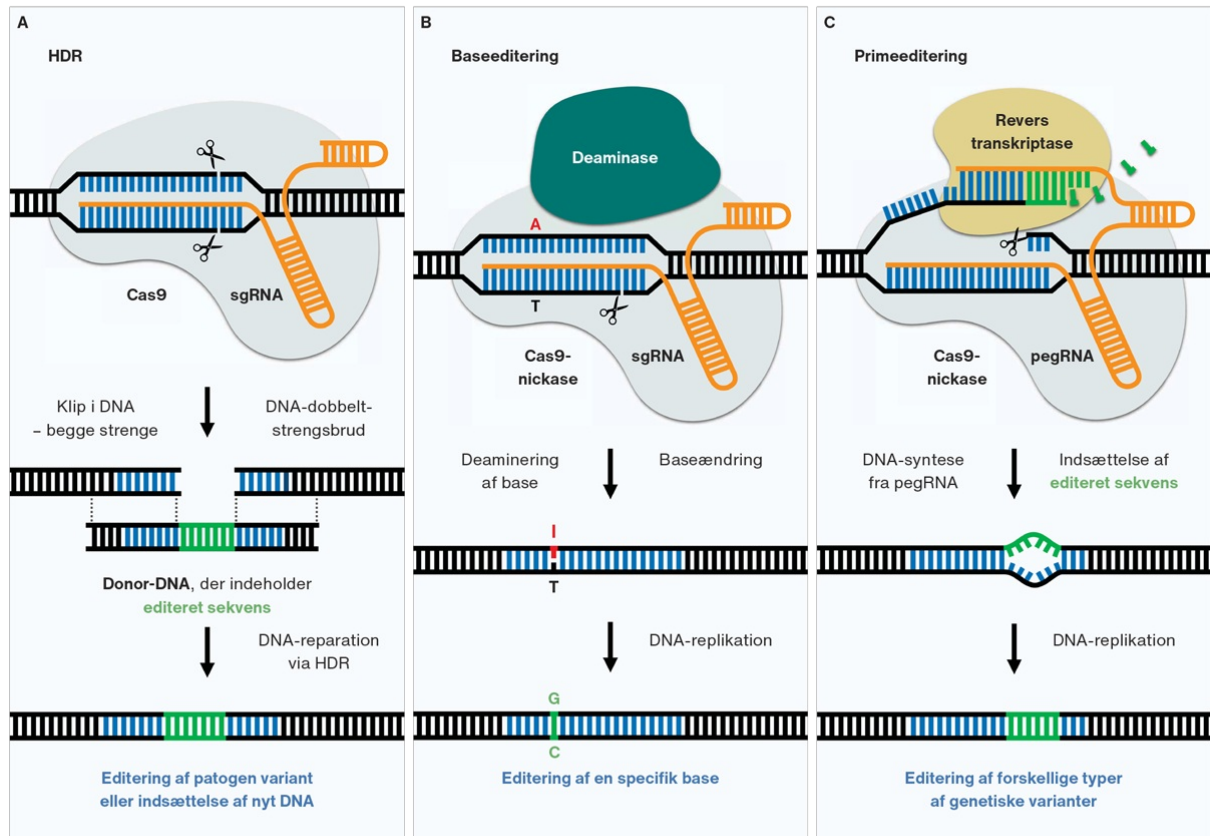
donor, og derved elimineres risikoen for immunologiske komplikationer og GVHD. Genterapi foretages typisk med en lentiviral (LV)-vektor, som er en modificeret replikationsdefekt version af human immundefekt virus (hiv), som sikrer effektiv overførsel og kromosomal integration af det terapeutiske gen i patientens egne hæmatopoietiske stamceller [3, 4]. PID er særligt velegnede målsygdomme for autolog stamcellegenterapi, idet ekstraktion og dyrkning af hæmatopoietiske stamceller muliggør ex vivo-LV-genterapi. Flere genterapiforsøg har siden 1990'erne vist stor effektivitet i flere typer af PID: alvorlig kombineret immundefekt (ADA-SCID og SCID-X1), Wiskott Aldrichs syndrom (WAS) og kronisk granulomatøs sygdom (CGD) [5-7]. Genterapi er dog ikke lige velegnet til alle PID og er ved nogle sygdomme ikke muligt af tekniske årsager. Trods effektiv behandling med LV-vektorer har flere patienter udviklet leukæmi, som skyldes indsættelse af det terapeutiske gen tæt på et protoonkogen og transaktivering af dette. Senest har syv ud af 67 patienter udviklet leukæmi i behandling af adrenoleukodystrofi, hvor målcellerne for LV-genterapi også var hæmatopoietiske stamceller [8]. I andre sygdomme har der dog ikke været observeret leukæmi eller tegn på insertional mutagenese, hvilket tyder på, at risikoen kan være specifik for den specifikke LV-vektor eller den pågældende sygdom [9]. Morbiditet og mortalitet i forbindelse med genterapi kan desuden relateres til den forudgående myelo- eller non-myeloablative konditionering, som i sig selv medfører toksicitet og øget risiko for infektioner og sekundær malignitet.

Redigering af genomet med CRISPR/Cas

CRISPR/Cas er en vigtig del af bakteriers forsvar mod virus (bakteriofager) og fungerer som en form for genetisk hukommelse fra tidligere infektioner, der gør det muligt at genkende og uskadeliggøre nye virusangreb. Betegnelsen clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) henviser til et lokus i bakteriers genom, hvor små DNA-fragmenter fra tidligere virusinfektioner lagres. Når bakterien senere udsættes for samme virus, bliver disse lagrede sekvenser transkriberet til små RNA-molekyler kaldet CRISPR RNA (crRNA). Disse crRNA-molekyler genkender og binder via baseparring til det indtrængende virus-DNA og guider dermed DNA-endonukleasen Cas (CRISPR-associeret) til det virale DNA. Dette fører til kløvning og henfald af DNA'et, hvilket forhindrer virusreplikation og beskytter bakterien mod infektion.

CRISPR/Cas-systemet kan tilpasses til helt andre formål i menneskeceller. Således viste *Emmanuel Charpentier* og *Jennifer Doudna* (Nobelprismodtagere i 2020), at Cas er aktivt i humane celler og kan målrettes en forudbestemt position i genomet i en proces styret af et designet RNA-molekyle kaldet single guide RNA (sgRNA) [10-12]. Den DNA-bindende del af sgRNA-molekylet kan tilpasses en relevant målsekvens og vil således via baseparring styre Cas til denne position i genomet. Men et klip i genomet er ikke i sig selv nok til at ændre på arvemassen. Det afgørende er, at cellens maskineri til reparation af DNA aktiveres i forbindelse med bruddet. Reparation via nonhomologous end joining (NHEJ) fører ofte til baseændringer i form af insertioner eller deletioner (indels) (Figur 1). Klippes der i et gen, vil dette typisk ødelægge læserammen og resultere i »knockout«. Er det til gengæld målet at introducere en bestemt ændring i genomet, f.eks. at korrigere en patogen genetisk variant, så er det nødvendigt at tilføre en såkaldt donor DNA-sekvens. Dette gør det muligt for cellen at reparere bruddet via homology-directed repair (HDR), hvor mekanismer for homolog rekombination anvender homologt donor-DNA som skabelon for reparation af det Cas-inducerede DNA-brud (Figur 1). Herved er det muligt at rette en genfejl nær det sted, hvor Cas klipper. Dette kaldes ofte »knockin« [13].

FIGUR 1 Tre forskellige CRISPR/Cas-baserede strategier til genredigering. **A.** Introduktion af dobbeltstrengsbrud med Cas9, der rekrutteres til en bestemt sekvens i genomet via base-parring mellem sgRNA og DNA. Ved at tilføje donor-DNA kan bruddet reparereres via HDR. **B.** Baseediting bruger en Cas9-nickase koblet til en deaminase, som kemisk ændrer en enkelt base i DNA'et, f.eks. A til G (som vist) eller C til T. Dette gør det muligt at korrigere punktmutationer. **C.** I primeediting benyttes en Cas9-nickase koblet til revers transkriptase. Teknikken udnytter, at revers transkriptase oversætter en lille del af et specialdesignet guide-RNA-molekyle (pegRNA) til DNA, hvorefter denne DNA-sekvens indsættes i genomet på den ønskede position. Denne metode kan således indsætte, slette eller præcist ændre små DNA-sekvenser ved at »skrive« nye genetiske instruktioner direkte ind i genomet. Figuren er udført med BioRender.



Cas = CRISPR-associeret; CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats; HDR = homology-directed repair; pegRNA = primeediting guide RNA; sgRNA = single guide RNA.

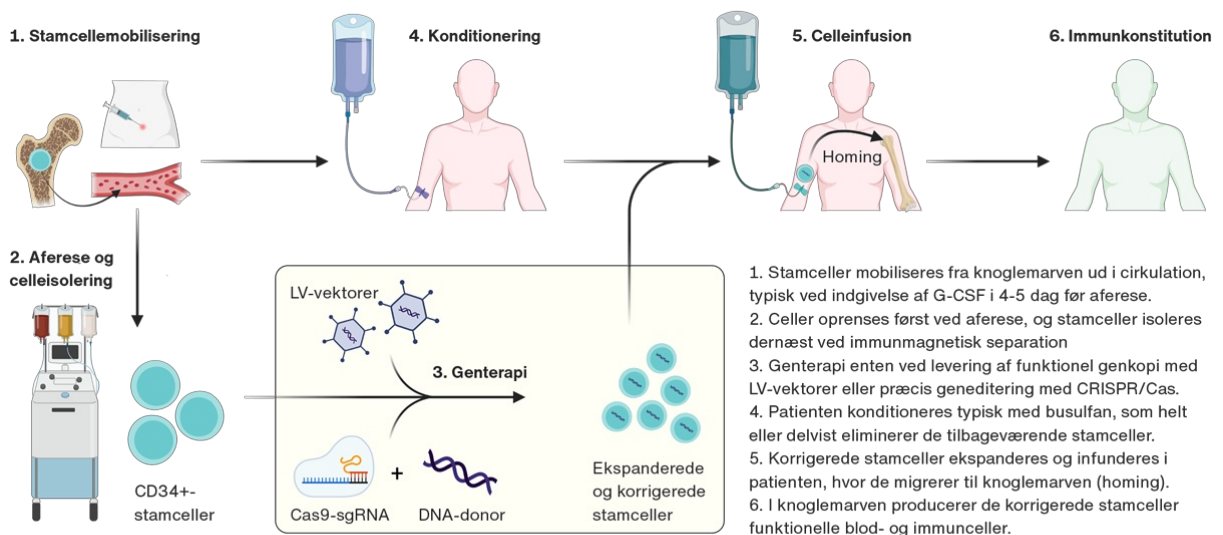
Begrænsninger ved homology-directed repair-baseret genredigering

HDR-baseret genredigering er kun muligt i celler, der deler sig, og i nogle sammenhænge kan effektiviteten derfor være lav. Ved anvendelse af teknologien er man desuden blevet opmærksom på, at CRISPR/Cas-inducerede DNA-brud i DNA kan aktivere cellulære DNA-skaderesponser, der bremser cellecycelus eller inducerer celledød. Hertil kommer en risiko for, at sgRNA-molekylet guider Cas til »forkerte« steder i genomet, hvilket kan føre til såkaldte »off-target« hændelser i form af klip og dermed introduktion af uønskede indels i arvemassen [12]. En mulig konsekvens af multiple brud i arvemassen er desuden kromosomtranslokationer. Der arbejdes på at udvikle mere præcise CRISPR-systemer og forbedrede metoder til at detektere og minimere disse effekter. To nyere CRISPR-baserede teknikker »baseediting« og »primeediting«, gør det muligt at rette genetiske mutationer med høj præcision uden dobbeltstrengsbrud og uden at tilføje donor-DNA [12, 13]. (Figur 1). Endelig er der stort fokus på, hvordan Cas og guide RNA kan leveres effektivt, præcist og sikkert, hvilket kan gøres enten med elektroporering, lipidnanopartikler eller modificerede viruspartikler [14-16].

Kliniske forsøgsbehandlinger med CRISPR/Cas

Behandlingsprocessen i forbindelse med ex vivo-geneditering af stamceller involverer isolering af patientens stamceller fra knoglemarven, kultivering i en bioreaktor, hvorunder Cas9, og syntetisk sgRNA leveres ved elektroporation og dernæst nedfrysning af cellerne, mens en lille andel kvalitetskontrolleres (Figur 2). Efter validering bliver patientens resterende stamceller helt eller delvis elimineret ved konditionering, ofte med busulfan, hvorefter de genmodificerede celler infunderes intravenøst og begynder at producere nye blodceller [12] (Figur 2). Den første kliniske anvendelse af CRISPR/Cas i vestlige lande var mod seglcelleanæmi og β -thalassæmi, begge forårsaget af varianter i β -globingenet [17]. I stedet for at korrigere patientmutationer har man udviklet en universel tilgang, hvor repression af gammaglobingenet ophæves ved knockout af *BCL11A*-genet, hvilket genetablerer føtalt hæmoglobin (HbF) og kompenserer for den manglende funktion af HbA. De kliniske afprøvninger af denne terapi med navnet exagamglogene autotemcel viste høj effektivitet og hidtil kurative resultater i begge sygdomme, og behandlingen blev i starten af 2024 godkendt ved Det Europæiske Lægemiddelagentur. Terapien blev i februar 2025 anbefalet af Medicinrådet og er dermed den første kommercielle CRISPR-terapi i Danmark [18, 19].

FIGUR 2 Skematisk proces for ex vivo-geneditering af stamceller. Stamcellerne mobiliseres (1), hvorefter cellerne høstes ved aferese, og stamcellerne oprenses via CD34-markøren (2). Cellerne kultiveres og ekspanderes i en bioreaktor (ikke vist), hvorunder CRISPR/Cas-komponenterne bestående af rekombinant Cas9 og syntetisk sgRNA leveres ved elektroporation (3). Ved LV-genterapi tilsættes LV-vektorer ved dette trin. De genredigerede stamceller nedfryses og kvalitetskontrolleres, hvorefter patientens resterende stamceller helt eller delvis elimineres ved konditionering (4). De genmodificerede celler infunderes derefter intravenøst (5), migrerer til knoglemarven (homing), hvorfra de rekonstruerer blod- og immunsystemet (6). Figuren er udført med BioRender.



Cas = CRISPR-associeret; CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats; G-CSF = granulocytstimulerende vækstfaktor; LV = lentiviral; sgRNA = single guide RNA.

CRISPR/Cas-revolutionen og implementering som terapeutisk mulighed ved primære immundefekter

CRISPR/Cas er en medicinsk revolution af flere årsager. For det første muliggør teknologien, at man med en enkelt behandling kan kurere sygdomme, som tidligere ikke har kunnet behandles på grund af manglende mål molekyler eller egnede lægemidler [10, 12, 13]. For det andet er CRISPR/Cas fleksibel og simpel at omprogrammere til nye genvarianter, hvilket muliggør udvikling af ny medicin på få uger. Ved at ændre den DNA-bindende del kan en ny sgRNA hurtigt produceres via standardiseret RNA-syntese. Bred klinisk anvendelse

til et større sygdomsspektrum er dog udfordret af begrænset leveringseffektivitet til afficeret væv grundet fysiske og immunologiske barrierer. Efter klinisk godkendelse er den næste udfordring de høje behandlingsomkostninger. Således udgør gentera-pier verdens fem dyreste lægemidler med listepri- ser fra 19,9 til 31,7 mio. kr. Balancen mellem omkostninger og fordele, herunder udbredelse til mindre sjældne sygdomme, vil derfor være en vigtig faktor i den fremtidige implementering af CRISPR-baserede terapier [12]. Den fleksible platformteknologi, som har lighed med mRNA-vacciner, er dog endnu ikke matchet af tilsvarende regulatoriske godkendelsesprocesser. I stedet kræver udviklingen af hver ny terapi en fuld præklinisk datapakke, som vurderes regulatorisk med hensyn til sikkerhed, effektivitet og off-target-effekter. På sigt er forhåbningen, at de regulatoriske krav balanceres, hvilket vil kunne facilitere skræddersyet medicin til de små og sjældne patientgrupper, der ikke har kommerciel interesse for medicinalvirksomheder, men hvor udviklingsarbejdet og behandlingerne kan varetages af akademiske eller nonprofitorganisationer. For det tredje har teknologien kurativt potentiale, hvilket til dels forklarer de eksorbitante priser De to konkurrerende godkendte CRISPR/Cas- og LV-baserede gentera-pier mod seglcelleanæmi og β -thalassæmi er prissat til henholdsvis 2,2 og 3,1 mio. dollars. Der er ingen klar tendens til, at den teknologiske modalitet i sig selv har afgørende betydning for prissætningen. I stedet synes faktorer som sygdommens alvorlighed og sjældenhed, dokumenteret klinisk effekt og forventede sundhedsøkonomiske gevinster at spille en større rolle i vurderingen af værdi og prissætning. De første skridt mod CRISPR/Cas-behandling af PID er taget med godkendelse af kliniske forsøg til kronisk granulomatøs sygdom (CGD)-patienter, hvor der testes genkorrektion både ved baseediting og primeediting (NCT06325709 og [20]). I Danmark arbejdes der i øjeblikket på udvikling af CRISPR/Cas-geneditering for sygdommene (CGD), hyper-IgE syndrom (HIES) og GATA-binding protein 2 (GATA2)-defekt ved HDR samt baseediting og primeediting af stamceller fra patienter. Dette sker på Aarhus Universitetshospital og Aarhus Universitet i regi af forskningscentret PASCAL-MID finansieret af Innovationsfonden.

Perspektiver og konklusioner

Siden identifikationen af de første genetisk betingede PID epidermodysplasia verruciformis (med udvikling af HPV-associerede papillomer og cancer) i 1946 samt Brutons X-bundne agammaglobulinæmi i 1952 er antallet og spektret af PID vokset betydeligt i takt med ny viden inden for basal immunologi samt udviklingen af helgenomsekventering til diagnostik og gentera-pi til behandling. Som beskrevet i denne statusartikel forekommer mulighederne for at anvende disse teknologier i klinisk og personlig medicin umiddelbart overvældende og nærmest ubegrænsede, og adskillige kliniske forsøg omfattende forskellige PID pågår aktuelt. De seneste års erfaringer har dog også afsløret adskillige tekniske, økonomiske og regulatoriske udfordringer, herunder uønskede effekter på genomintegritet og genekspression, som understreger vigtigheden af yderligere forsøg samt udviklingen af sekventeringsværktøjer til at garantere sikkerheden ved klinisk anvendelse. Der er dog ingen tvivl om, at CRISPR/Cas-geneditering er et potentielt meget effektivt og lovende redskab til kurativ behandling af en række alvorlige monogene sygdomme, hvortil vi i dag har utilstrækkelige eller manglende terapeutiske muligheder. Fremtiden vil vise, i hvilket omfang CRISPR/Cas-teknologien kan udfylde sit fulde potentiale til at revolutionere personlig medicin i behandling af PID med tilfredsstillende specificitet, stabilitet og sikkerhed.

Korrespondance Trine Mogensen. E-mail: trine.mogensen@biomed.au.dk

Antaget 14. april 2025

Publiceret på ugeskriftet.dk 26. maj 2025

Interessekonflikter ROB, MH, BMK, JGM, THM oplyser økonomisk støtte fra Innovationsfonden, Job Research Foundation, Novo Nordisk Fonden og Carlsbergfondet. ROB oplyser derudover økonomisk støtte fra eller

interesse i Novo Nordisk, UNIKUM Therapeutics samt patenter relateret til CRISPR/Cas-genomredigering og celleterapi. BMK oplyser derudover økonomisk støtte fra eller interesse i Beta Health®, Indenrigs- og Sundhedsministeriet, Bloddonorerne Danmark, Gigtforeningen, Medicinrådet, Lægemiddelstyrelsen, European Blood Alliance, Scandiatransplant, Life Science Denmark og Novo Nordisk. JGM oplyser derudover økonomisk støtte fra eller interesse i Independent Research Fund Denmark, Nvelop Therapeutics, Folkeuniversitetet, Dagens Medicin, Etisk råd, Novo Nordisk A/S, Sana Biotechnology, CSL Behring, American Society of Gene and Cell Therapy, European Society of Gene & Cell Therapy, the French Society of Gene and Cell Therapy samt patienter relateret til CRISPR/Cas-genomredigering og celleterapi. Alle forfattere har indsendt ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Disse er tilgængelige sammen med artiklen på ugeskriftet.dk.

Referencer findes i artiklen publiceret på ugeskriftet.dk

Artikelreference Ugeskr Læger 2025;187:V02250083

doi 10.61409/V02250083

Open Access under Creative Commons License CC BY-NC-ND 4.0

SUMMARY

CRISPR/Cas gene editing of haematopoietic stem cells for curing primary immunodeficiency

Primary immunodeficiencies are rare monogenic inborn errors of immunity and can involve any combination of infection, autoimmunity, inflammation, and malignancy. While increased use of whole genome sequencing has vastly improved diagnosis, curative treatment options beyond haematopoietic stem cell transplantation are still lacking behind. In this review, we present and discuss the promising avenues of CRISPR/Cas gene editing of patient stem cells for curing these diseases through homology-directed repair, base- or prime editing and delivery by nanoparticles or viral derivatives. However, technological, regulatory, and economic challenges exist on the road to safe and broad implementation of this technology for personalized medicine in the clinic.

REFERENCER

1. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Human inborn errors of immunity: 2022 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2022;42(7):1473-1507. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01289-3>
2. Thalhammer J, Kindle G, Nieters A, et al. Initial presenting manifestations in 16,486 patients with inborn errors of immunity include infections and noninfectious manifestations. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(5):1332-1341.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.04.015>
3. Ifversen MS, Masmas TN, Kornblit B, et al. Behandling af monogene sygdomme ved viral transduktion af hæmatopoietiske stamceller. *Ugeskr Læger.* 2020;182:V06200458. <https://ugeskriftet.dk/videnskab/behandling-af-monogene-sygdomme-ved-viral-transduktion-af-haematopoietiske-stamceller>
4. Wolff JH, Mikkelsen JG. Delivering genes with human immunodeficiency virus-derived vehicles: still state-of-the-art after 25 years. *J Biomed Sci.* 2022;29(1):79. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00865-4>
5. Candotti F, Shaw KL, Muul L, et al. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood.* 2012;120(18):3635-3646. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-400937>
6. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet.* 2004;364(9452):2181-2187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17590-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17590-9)
7. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, et al. Autologous ex vivo lentiviral gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med.* 2021;384(21):2002-2013. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027675>
8. Eichler F, Duncan C, Musolino PL, et al. Lentiviral gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med.* 2024;391(15):1302-1312. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2400442>

9. Calabria A, Spinozzi G, Cesana D, et al. Long-term lineage commitment in haematopoietic stem cell gene therapy. *Nature*. 2024;636(7730):162-171. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08250-x>
10. Fox TA, Booth C. Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Br J Haematol*. 2021;193(6):1044-1059. <https://doi.org/10.1111/bjh.17269>
11. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816-821 <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
12. Laurent M, Geoffroy M, Pavani G, Guiraud S. CRISPR-based gene therapies: from preclinical to clinical treatments. *Cells*. 2024;13(10):800. <https://doi.org/10.3390/cells13100800>
13. Ghanim HY, Porteus MH. Gene regulation in inborn errors of immunity: implications for gene therapy design and efficacy. *Immunol Rev*. 2024;322:157-177 <https://doi.org/10.1111/imr.13305>
14. Fontana M, Solomon SD, Kachadourian J, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing with Nexiguran Ziclumeran for ATTR Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2024;391(23):2231-2241. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2412309>
15. Janns JH, Mikkelsen JG. Gene editing by ferrying of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes in enveloped virus-derived particles. *Hum Gene Ther*. 2024;35:604-616 <https://doi.org/10.1089/hum.2024.105>
16. Laustsen A, Bak RO. Electroporation-based CRISPR/Cas9 gene editing using Cas9 protein and chemically modified sgRNAs. *Methods Mol Biol*. 2019;1961:127-134 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_9
17. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2021;384:252-260 <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
18. Frangoul H, Locatelli F, Sharma A, et al. Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2024;390(18):1649-1662. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309676>
19. Locatelli F, Lang P, Wall D, et al. Exagamglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2024;390(18):1663-1676. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309673>
20. Bzhilyanskaya V, Ma L, Liu S, et al. High-fidelity PAMless base editing of hematopoietic stem cells to treat chronic granulomatous disease. *Sci Transl Med*. 2024;16(769):eadj6779. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adj6779>