

## Η εξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας

Ευαγγελία Γιαννάκη<sup>1,2</sup>, Βαρνάβας Κωνσταντίνου<sup>1</sup>, George Stamatoyannopoulos<sup>2</sup>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ Η γονιδιακή θεραπεία, η αιτιολογική δηλαδή αντιμετώπιση ασθενειών στο γενετικό επίπεδο, υπήρξε θεωρητικός στόχος της ιατρικής από τη δεκαετία του '70, όταν τεκμηριώθηκε η συσχέτιση γενετικών νόσων με τις γονιδιακές μεταλλάξεις. Οι πρώτες πειραματικές προσπάθειες γονιδιακής θεραπείας στη δεκαετία του '80 αντιμετώπισαν δύο βασικά ερωτήματα: τον τρόπο μεταφοράς του θεραπευτικού γενετικού υλικού και την επιλογή του κύτταρου-στόχου. Με τη ραγδαία πρόοδο της βιοτεχνολογίας, οι πρώτες κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας έγιναν στις αρχές της δεκαετίας του '90 χωρίς όμως την αναμενόμενη επιτυχία, γεγονός που έστρεψε τους ερευνητές για αρκετά χρόνια πίσω στη βασική έρευνα. Η πρώτη μεγάλη επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας ήταν το 2000, όταν, παιδιά που έπασχαν από τη θανατηφόρο ανοσοανεπάρκεια X-SCID, ιάθηκαν μετά από τη χορήγηση γενετικά διορθωμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, με χρήση γ-ρετροϊκού φορέα για τη μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου στα κύτταρα. Η αδιαμφισβήτητη αυτή επιτυχία επισκιάστηκε ακολούθως από την αναγνώριση τοξικότητας που σχετίστηκε με τη μέθοδο (εισχωρητική ογκογένεση) ενώ ταυτόχρονα ανέδειξε την ανάγκη σχεδιασμού νέων, ασφαλέστερων ιικών φορέων ή και άλλων μεθόδων για τη γενετική τροποποίηση. Σήμερα, με τη χρήση ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων φορέων (λεντιϊκοί φορείς, AAV φορείς) διεξάγονται παγκοσμίως εκατοντάδες κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας για δυσίατες κληρονομικές αλλά και επίκτητες νόσους, με σημαντικά αποτελέσματα. Το πεδίο όμως παραμένει σε συνεχή εξέλιξη και η γονιδιακή στόχευση/διόρθωση (gene editing) που επιτυγχάνει στοχευμένη και θεωρητικά ασφαλέστερη γενετική τροποποίηση ανοίγοντας το δρόμο για καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις, σηματοδοτεί τη μελλοντική πορεία της γονιδιακής θεραπείας. Στην ανασκόπηση που ακολουθεί θα γίνει μία ιστορική αναδρομή με επισήμανση των οροσήμων που επέδρασαν καθοριστικά στην ανάπτυξη και εξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας.

Haema 2016; 7(1): 45-56 Copyright EAE

### Μια σύντομη αναδρομή στο παρελθόν

Οι πρώτες θεωρητικές σκέψεις για γονιδιακή θεραπεία έγιναν στο τέλος της δεκαετίας του '60, όταν μελέτες για τις αιμοσφαιρινοπάθειες αποκάλυψαν ότι γονιδιακές μεταλλάξεις, οι οποίες δεν ήταν εφικτό να διορθωθούν με συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, αποτελούσαν τον αιτιολογικό παράγοντα αυτών των γενετικών νόσων. Αυτό έγινε επίσης προφανές στη δεκαετία του '70, όταν με τη χρήση βιοτεχνολογίας για τη μελέτη του DNA, διερευνήθηκε το γενετικό υπόστρωμα των θαλασσαιμιών

και αποκαλύφθηκαν οι δομικές γονιδιακές ανωμαλίες, περιλαμβανομένων και των απαλείψεων, που αποτελούσαν τη μοριακή βάση αυτών των κληρονομικών ασθενειών. Έτσι, το ενδιαφέρον στράφηκε στη γονιδιακή θεραπεία που, εκτός από αιτιολογική θεραπεία, θα μπορούσε να αποτελέσει και τη ριζική-ισόβια αντιμετώπιση κληρονομικών αλλά και επίκτητων γενετικών νόσων.

Οι πρώτες πειραματικές προσπάθειες για γονιδιακή θεραπεία έγιναν στις αρχές της δεκαετίας του '80.<sup>1-3</sup> Η θεωρητική τους βάση στηριζόταν στην ιδέα πως γενετικές ασθένειες θα μπορούσαν να ιαθούν με την προσθήκη φυσιολογικών γονιδίων στα κύτταρα ασθενών που θα υποκαθιστούσαν τη λειτουργία των παθολογικών γονιδίων. Τα βασικά ερωτήματα για την ευδόωση αυτών των προσπαθειών ήταν i) ο τρόπος μεταφοράς του θεραπευτικού γονιδίου και ii) τα κύτταρα-στόχος της γονιδιακής μεταφοράς. Παρά το γεγονός, όμως, της εντυπωσιακής

<sup>1</sup>Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική Κλινική-Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών, Νοσοκομείο Γ. Παπανικολάου, Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup>Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA  
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ευαγγελία Γιαννάκη, Αιματολογική Κλινική-ΜΜΜΟ, Νοσοκομείο Γ. Παπανικολάου, Εξοχή, 57010 Θεσσαλονίκη, Τηλ.: 2313-307518, E-mail: eyannaki@u.washington.edu

πρόοδου των τελευταίων 30 χρόνων, τα ερωτήματα για το γονιδιακό 'όχημα' (gene vehicle) και για τα κύτταρα-στόχους παραμένουν ακόμη εν μέρει αναπάντητα, καθώς περισσότερες ασθένειες μπαίνουν στο στόχαστρο της γονιδιακής θεραπείας.

Από την αρχή των πειραματικών προσπαθειών, έγινε αντιληπτή η ποικιλία και διαφορετικότητα των 'οχημάτων' μεταφοράς του θεραπευτικού γενετικού υλικού. Οι ιικοί μεταφορείς (viral vectors), τροποποιημένοι ιοί, που με βάση τις βιολογικές τους ιδιότητες θα μπορούσαν να μεταφέρουν γενετικό υλικό στα διαμολυσμένα κύτταρα, απετέλεσαν την πρώτη μεγάλη κατηγορία γονιδιακών 'οχημάτων'. Χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τύποι ιών όπως ρετροϊοί, αδενοϊοί, αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (AAV) και άλλοι ιοί. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και μη-ιικοί φορείς και διάφοροι τύποι νουκλεϊνικών οξέων. Σήμερα υπάρχει ικανοποιητική γνώση για το ποια είδη γονιδιακών φορέων θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με το νόσημα-στόχο και πιο συγκεκριμένα παραδείγματα θα δοθούν στη συνέχεια του άρθρου. Η γνώση αυτή ήταν εύλογα απύσχα στα πρώτα χρόνια των ερευνητικών προσπαθειών. Για παράδειγμα, απαιτήθηκε αρκετό διάστημα για να γίνει αντιληπτό ότι για τη γονιδιακή θεραπεία αρκετών ασθενειών απαιτούνταν 'οχήματα' γονιδιακής μεταφοράς που θα είχαν την ιδιότητα της μόνιμης ενσωμάτωσης του μεταφερόμενου γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του κυττάρου-στόχου. Τα τελευταία 30 χρόνια η πρόοδος στο πεδίο της κατασκευής γονιδιακών 'οχημάτων' είναι τεράστια. Οι ιικοί φορείς σχεδιάστηκαν εκ νέου και δεν υπάρχουν πλέον ανησυχίες για ενδεχόμενη μολυσματικότητα τους και πρόκληση λοίμωξης. Τα θέματα που δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως σχετικά με τους ιικούς φορείς αφορούν στην ενδεχόμενη ανοσογονικότητά τους<sup>4,5</sup> και στην πιθανότητα να προκαλέσουν εισχωρητική ογκογένεση.<sup>6</sup>

## Τα πρώτα βήματα της γονιδιακής θεραπείας

Το 1990 το FDA ενέκρινε για πρώτη φορά μελέτη γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο σε παιδιά που έπασχαν από ανοσοανεπάρκεια λόγω έλλειψης ADA (adenosine deaminase deficiency) και λίγο αργότερα, ανάλογη μελέτη ξεκίνησε και στην Ευρώπη.<sup>7,8</sup> Οι πρώτοι κλινικοί ερευνητές ξεκίνησαν με ιδιαίτερο ενθουσιασμό, αλλά αρκετές από τις κλινικές μελέτες υστερούσαν σε σχεδιασμό. Για παράδειγμα, κλινικές δοκιμές για γονιδιακή θεραπεία της ανοσοανεπάρκειας λόγω έλλειψης ADA (adenosine deaminase deficiency) ή της χρονίας κοκκιωματώδους νόσου (CGD) με χρήση ρετροϊκών φορέων σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, αποτύγχαναν συστηματικά είτε λόγω απουσίας χρήσης προπαρασκευαστικού σχήματος πριν την έγχυση των γενετικά διορθωμένων κυττάρων, είτε λόγω συνέχισης της θεραπείας υποκατάστασης

(PEG-ADA) και μετά τη χορήγηση των τροποποιημένων κυττάρων. Και στις δύο περιπτώσεις δημιουργούνταν ισχυρός ανταγωνισμός για εμφύτευση μεταξύ των γενετικά διορθωμένων κυττάρων και των ενδογενών του μυελού οστών, με επικράτηση των τελευταίων.<sup>9,10</sup>

Παρά το γεγονός ότι οι πρώτες μελέτες δεν στέφθηκαν με την αναμενόμενη επιτυχία, οι κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας επεκτάθηκαν σημαντικά, μέχρι τον τραγικό θάνατο το 1998, ενός 18χρονου, που έπασχε από μία μάλλον ήπια μορφή ανεπάρκειας του ενζύμου τρανσκαρβαμυλάση της ορνιθίνης (OTC). Ο θάνατος συνέβη λόγω ανοσολογικής αντίδρασης (μη-ειδική ανοσία) προς την πρωτεΐνη του καψιδίου του αδενοϊού που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας του θεραπευτικού γονιδίου.<sup>11</sup> Ο θάνατος αυτός προκάλεσε την προσωρινή διακοπή όλων των κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας στις Η.Π.Α και ήγειρε ερωτήματα όχι μόνο για την ασφάλεια αλλά και για το μέλλον των κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας.

## Οι πρώτες επιτυχίες στις ανοσοανεπάρκειες και η αναγνώριση τοξικότητας που σχετίζεται με τη μέθοδο

Η πρώτη αδιαμφισβήτητη επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) ήλθε το 2000, σε παιδιά που έπασχαν από τη θανατηφόρα, σε πρώιμη παιδική ηλικία, ανοσοανεπάρκεια X-SCID, οδηγώντας έτσι σε αναγέννηση της γονιδιακής θεραπείας για τα γενετικά νοσήματα.<sup>12</sup> Οι ασθενείς έλαβαν γενετικά διορθωμένα κύτταρα, με τη χρήση ενός ρετροϊκού φορέα που μετέφερε το φυσιολογικό γονίδιο (IL2RG) στα HSCs χωρίς να προηγηθεί μυελοκαταστολή. Η X-SCID αποτελεί τη μόνη περίπτωση γενετικού νοσήματος στην οποία η έλλειψη conditioning μπορεί να συνοδεύεται από επιτυχή εμφύτευση των τροποποιημένων κυττάρων, καθώς το υπόστρωμα της νόσου προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης στα γενετικά διορθωμένα κύτταρα.<sup>13</sup> Το αποτέλεσμα της θεραπείας ήταν εντυπωσιακό: τα καλούμενα, λόγω του εξαιρετικά ευάλωτου στις ευκαιριακές λοιμώξεις ανοσολογικού τους συστήματος, 'παιδιά της γυάλας' (bubble boys), μπόρεσαν μετά τη θεραπεία να αποκτήσουν ανοσολογική επάρκεια και να φοιτήσουν στο σχολείο, να κοινωνικοποιηθούν πλήρως και να διακόψουν τη συχνή ενδοφλέβια χορήγηση σφαιρινών.

Λίγο αργότερα ακολούθησαν επιτυχίες μελέτες στην ADA-SCID και CGD όπου η χρήση ενός μερικής μυελοκατασταλτικού conditioning και η ελάττωση ή διακοπή της θεραπείας υποκατάστασης οδήγησαν σε σημαντική βελτίωση στη CGD και ίαση στην ADA-SCID, καθώς ενίσχυναν την εγκατάσταση και εμφύτευση των γενετικά τροποποιημένων αιμοποιητικών κυττάρων των ασθενών.<sup>14-16</sup>

Σύντομα όμως, οι σημαντικές πρώτες επιτυχίες επισκιάστηκαν από το γεγονός της εμφάνισης λεμφοβλαστι-

κής λευχαιμίας στο 20% (5/20) των ασθενών με X-SCID που υποβλήθηκαν σε γονιδιακή θεραπεία, λόγω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων από την ενσωμάτωση του ιικού φορέα σε συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα του κυττάρου (εισχωρητική μεταλλαξιγένεση).<sup>17,18</sup> Παρά το γεγονός ότι 19 από τους 20 ασθενείς με X-SCID που υποβλήθηκαν στη διαδικασία είναι σήμερα εν ζωή και υγιείς - ενώ κανείς δεν αναμενόταν να ζει χωρίς τη συγκεκριμένη θεραπευτική παρέμβαση - η σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια της λευχαιμογένεσης λόγω της γονιδιακής θεραπείας στη συγκεκριμένη κλινική μελέτη, έθεσε σοβαρά ερωτήματα για την ασφάλεια των ικών φορέων.

Το γεγονός της λευχαιμογένεσης, που παρατηρήθηκε και σε άλλες περιπτώσεις ανοσοανεπάρκειας (Wiskott-Aldrich)<sup>19,20</sup> μετά από γονιδιακή θεραπεία με χρήση ρετροϊκού φορέα, αποτέλεσε τη βάση για τον επανασχεδιασμό των κλινικών μελετών ως προς την ασφάλεια. Πράγματι, ένας νέος τομέας μελέτης της βιολογίας της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης αναπτύχθηκε σε απάντηση της πρόκλησης γενοτοξικότητας από τους ικούς φορείς, ανακαλύφθηκαν νέες τεχνικές ανάλυσης των επιδράσεων της ενσωμάτωσης των φορέων σε γενομικό επίπεδο και αναλύθηκε το πρότυπο ενσωμάτωσης των γ-ρετροϊκών φορέων στο γονιδίωμα. Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν ότι η ενσωμάτωση των ικών φορέων στο γονιδίωμα δεν ακολουθεί, όπως αρχικά είχε θεωρηθεί, απόλυτα τυχαία κατανομή, αλλά ένα τουλάχιστον «ημιτυχαίο» πρότυπο: οι γ-ρετροϊκοί φορείς «προτιμούν» την ενσωμάτωση σε περιοχές έναρξης της μεταγραφής ενώ οι λεντιϊκοί φορείς ενσωματώνονται κατά προτίμηση εντός ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων.<sup>21,22</sup> Κατά συνέπεια, το πρότυπο ενσωμάτωσης των λεντιϊκών φορέων τους καθιστά ασφαλέστερους, για κλινική χρήση, φορείς.

### Λεντιϊκοί φορείς νεότερης γενιάς

Μετά την αναγνώριση της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης ως κύριας τοξικότητας της γονιδιακής θεραπείας με χρήση γ-ρετροϊκών φορέων, καθώς και του ασφαλέστερου προτύπου ενσωμάτωσης των λεντιϊκών φορέων σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να διαμολύνουν και μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως είναι τα HSCs, τα τελευταία χρόνια στις κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας επικράτησαν οι λεντιϊκοί φορείς. Οι λεντιϊκοί φορείς νεότερης γενιάς (SIN vectors)<sup>23</sup> κατασκευάζονται με πρόσθετα χαρακτηριστικά ασφαλείας, όπως ο σχεδιασμός αυτοαδρανοποίησης (self-inactivation/SIN), βάσει του οποίου απαλείφεται η περιοχή U3 από την LTR οπότε το θεραπευτικό γονίδιο μεταγράφεται από εσωτερικό υποκινητή και έτσι καταργείται ο μείζων παράγοντας γενοτοξικότητας, η ιική LTR. Επιπρόσθετα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης, κάποιοι λεντιϊκοί φορείς σχεδιάζονται με την προσθήκη

ενός μονωτή χρωματίνης με δράση διακόπτη ενισχυτών, ο οποίος μπλοκάρει τη ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου όταν ο φορέας ενσωματωθεί στη γειτονία ογκογονιδίου.<sup>24</sup>

### Η παρούσα κατάσταση

Τα τελευταία χρόνια παρακολουθούμε μια αναγέννηση στο πεδίο των κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας. Αρκετές κλινικές μελέτες φάσης I-III (αρκετές από τις οποίες χρηματοδοτούνται από μεγάλες φαρμακευτικές εταιρίες) διεξάγονται σε παγκόσμιο επίπεδο. Αυτές οι κλινικές μελέτες διερευνούν την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας σε διάφορες ασθένειες, όπως καρκίνους, νευρολογικά, αιματολογικά, αγγειακά, οφθαλμολογικά νοσήματα κτλ. Η αναζωπύρωση αυτή των κλινικών δραστηριοτήτων αντικατοπτρίζει απλά την πρόοδο που υπήρξε στον εργαστηριακό τομέα και αναδεικνύει ακόμα μια φορά τη σημασία της βασικής έρευνας στην ανάπτυξη νέων θεραπειών.

Πιο κάτω συνοψίζουμε τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών που εστιάζουν στην ανάπτυξη θεραπειών για αιματολογικές νόσους.

### Γονιδιακή θεραπεία Αιμοφιλίας

Αρκετές, διαφορετικές προσεγγίσεις με χρήση ικών φορέων έχουν δοκιμαστεί για τη γονιδιακή θεραπεία της αιμοφιλίας με επικρατέστερους τους αδενοσχετιζόμενους ικούς φορείς (AAV). Λόγω του σημαντικά μικρότερου μεγέθους του παράγοντα IX σε σχέση με τον παράγοντα VIII, που επέτρεπε το αποτελεσματικό πακετάρισμα του γονιδίου IX στους AAV ικούς φορείς, η έμφαση δόθηκε αρχικά στην ανάπτυξη γονιδιακής θεραπείας για την αιμοφιλία B (έλλειψη παράγοντα IX).

Πρώιμες προκλινικές δοκιμές σε ζωικά μοντέλα ήταν επιτυχείς στη διόρθωση της έλλειψης του παράγοντα IX,<sup>25,26</sup> ο δρόμος όμως προς τις κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους αποδείχθηκε αρκετά περίπλοκος. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές από αρκετούς ερευνητές στις Η.Π.Α, καθώς και από μία εταιρία βιοτεχνολογίας, έκαναν χρήση εγχύσεων ενός αδενο-σχετιζόμενου ικού φορέα που μετέφερε τον παράγοντα IX στην ηπατική αρτηρία των ασθενών, αλλά με πολύ μικρό θεραπευτικό όφελος και ταυτόχρονα εμφάνιση ανοσολογικών προβλημάτων.<sup>27</sup> Μελέτη που ακολούθησε με ίδιο τύπο φορέα και ενδομυϊκή έγχυσή του σε πολλαπλά σημεία, δεν απέδωσε επίσης το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα.<sup>28</sup>

Η πρόοδος προήλθε από τη βασική έρευνα στην ιολογία που αποκάλυψε μια πληθώρα ορολογικών τύπων αδενο-σχετιζόμενων ιών, ένας εκ των οποίων, ο AAV-8, είχε ισχυρό τροπισμό για τα ηπατοκύτταρα. Η πρώτη επιτυχής κλινική μελέτη γονιδιακής θεραπείας για την αιμοφιλία που ανακοινώθηκε το 2011 έκανε χρήση ενός

AAV-8 φορέα σε 6 ασθενείς με αιμοφιλία Β.<sup>29</sup> Τέσσερις από τους έξι ασθενείς διέκοψαν την προφυλακτική χορήγηση του παράγοντα ΙΧ και 2/6 αραιώσαν τα διαστήματα της θεραπείας υποκατάστασης. Τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα ΙΧ που επιτεύχθηκαν ήταν δοσοεξαρτώμενα και κυμάνθηκαν στο 2-11%, ενώ οι ανοσολογικές αντιδράσεις που παρατηρήθηκαν με τη μορφή τρανσ-μινασαιμίας (στη χορήγηση των υψηλότερων δόσεων) ήταν ήπιες και αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς με παροδική χρήση στεροειδών.

Αυτή η κλινική μελέτη είχε μεγάλο αντίκτυπο στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας. Μεγάλες φαρμακευτικές εταιρίες αναπτύσσουν τώρα νέες προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας για την αιμοφιλία Β και την αιμοφιλία Α. Η χρήση των AAV-8 φορέων και η επιλεκτική τους συγκέντρωση στο ήπαρ ανοίγει το δρόμο για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών οι οποίες οφείλονται σε ανεπάρκεια ή έλλειψη πρωτεϊνών του ηπατοκυττάρου. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που παραμένει είναι τεχνικής φύσης και εστιάζεται στη δυσκολία παραγωγής του θεραπευτικού AAV φορέα σε επίπεδο κλινικής κλίμακας, αλλά αυτό αναμένεται να επιλυθεί από την εμπειρία της φαρμακευτικής και βιοτεχνολογικής βιομηχανίας. Επίσης, οι αδενο-σχετιζόμενοι φορείς παραμένουν κυρίως επισωματικοί (μόνο ένα μικρό ποσοστό τους ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου). Λόγω του γεγονότος αυτού, οι ασθενείς αναμένεται να χρειαστούν ξανά θεραπεία σε μελλοντικό στάδιο, πράγμα που μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας διαφορετικού ορολογικού τύπου αδενο-σχετιζόμενους φορείς.

### Γονιδιακή θεραπεία ανοσοανεπάρκειών

Οι ασθενείς αυτές (ADA-SCID, SCID-X1, CGD and WAS) απετέλεσαν έναν από τους πρώτους στόχους κλινικών δοκιμών στη γονιδιακή θεραπεία. Η ίαση ασθενών με X-SCID μετά από γονιδιακή θεραπεία με γ-ρετροϊκούς φορείς, όπως προαναφέρθηκε, σηματοδότησε την πρώτη αδιαμφισβήτη επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας,<sup>12,30</sup> αλλά ταυτόχρονα και τη δυσάρεστη διαπίστωση σοβαρής τοξικότητας που σχετίζεται με τη μέθοδο, υπό τη μορφή της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης.<sup>17</sup>

Δεδομένα της μακροχρόνιας έκβασης κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας στις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες που στην πλειονότητά τους έκαναν χρήση συμβατικών γ-ρετροϊκών φορέων, έδειξαν σαφή αποτελεσματικότητα, με άνω του 90% των ασθενών να επιβιώνουν μακροχρόνια.<sup>31,32</sup> Τα αποτελέσματα αυτά είναι εντυπωσιακά όταν συγκρίνονται με άλλες εναλλακτικές θεραπείες και τη μεταμόσχευση με μερική ασυμβατότητα HLA. Η εισχωρητική μεταλλαξιγένεση που παρατηρήθηκε περίπου στο 10% του συνόλου των ασθενών με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, δείχθηκε ότι ακολου-

θεί ένα κοινό πρότυπο ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων που διαμεσολαβείται από την παρουσία ενισχυτών στην περιοχή U3 5' long terminal repeat (LTR) των γ-ρετροϊκών φορέων.

Η αντικατάσταση των γ-ρετροϊκών φορέων με SIN γ-ρετροϊκούς<sup>33</sup> και λεντιικούς φορείς σε πρόσφατες κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με X-SCID και με σύνδρομο Wiskott-Aldrich (WAS)<sup>34</sup> οδήγησε σε ίαση των ασθενών, χωρίς το προφίλ ενσωμάτωσης των λεντι-ικών φορέων να σχετίζεται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή με κλωνική έκπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής θεραπείας στις ανοσοανεπάρκειες συνολικά, υποστηρίζουν ότι η γονιδιακή θεραπεία έχει περάσει από το στάδιο της απόδειξης της αρχής (proof of principle) και θεραπευτικών υποσχέσεων σε μια ιατρική που θα μπορούσε, σε επιλεγμένες περιπτώσεις, να αποτελέσει θεραπεία πρώτης γραμμής και μια καταχωρημένη, στη φαρμακευτική αγορά, θεραπευτική μέθοδο για ποικιλία γενετικών νόσων σε περιπτώσεις όπου οι συμβατικές θεραπείες αποτυγχάνουν ή δεν είναι διαθέσιμες.

### Γονιδιακή θεραπεία λυσοσωμικών νόσων

Η πρόσφατη επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας στις λυσοσωμικές νόσους παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί καταδεικνύει τον τρόπο μελλοντικής εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (stem cell gene therapy) για τη θεραπεία πολλών νόσων, με την παραγωγή από τα γενετικά τροποποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα της θεραπευτικής πρωτεΐνης. Στις κλινικές δοκιμές για τη φυλοσύνδετη αδρενολευκοδυστροφία (X-ALD)<sup>35</sup> και τη μεταχρωματική λευκοδυστροφία (MLD)<sup>36</sup> διαμολύνθηκαν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών με τρίτης γενιάς λεντι-ικούς φορείς που μετέφεραν φυσιολογικό αντίγραφο του γονιδίου το οποίο είναι μεταλλαγμένο σε κάθε νόσο (ABCD1 και ARSA, αντίστοιχα). Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα κύτταρα που προήλθαν από τα γενετικά τροποποιημένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μετανάστευσαν στο κεντρικό νευρικό σύστημα όπου απέδωσαν μεταβολικά προϊόντα φυσιολογικής πλέον ενζυμικής δραστηριότητας με αποτέλεσμα τη διακοπή της νευρολογικής παθολογίας των ασθενών. Τα θεραπευτικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις αυτές αναμένονται όταν η γονιδιακή θεραπεία εφαρμοστεί πριν από την εγκατάσταση σοβαρής νευρολογικής σημειολογίας. Στην περίπτωση της MLD, τα παιδιά διαγνώστηκαν και υποβλήθηκαν στη μέθοδο σε προσυμπτωματική φάση, καθώς υπήρχε σε όλες τις περιπτώσεις ένα ήδη προσβεβλημένο παιδί στην οικογένεια.

Τέσσερις ασθενείς με ALD και 3 με MLD υποβλήθηκαν σε γονιδιακή θεραπεία μετά από ένα πλήρως μυελοκατασταλτικό conditioning. Τα επίπεδα των γενετικά

διορθωμένων κυττάρων σταθεροποιήθηκαν στο 10% στο περιφερικό αίμα στην ALD και εντυπωσιακά, στο 65% στον μυελό των οστών στην MLD. Στους ασθενείς με ALD διεκόπη η πρόοδος της απομυελίνωσης στους 14-16 μήνες μετά τη διαδικασία, αποτέλεσμα ανάλογο με της αλλογενούς μεταμόσχευσης. Στους ασθενείς με MLD η νόσος δεν εκδηλώθηκε ή δεν προόδευσε απεικονιστικά 7-21 μήνες μετά την προβλεπόμενη ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων. Και στις δυο κλινικές μελέτες η ανάλυση των θέσεων ενσωμάτωσης των λεντι-υκών φορέων έδειξε πολυκλωνική αιμοποίηση χωρίς παράδοση κλωνική συμπεριφορά.

Οι ασθένειες αυτές είναι αρκετά σπάνιες, η αρχή όμως της γονιδιακής θεραπείας σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα για την αντιμετώπιση ενζυμοπαθειών έχει διευρύνει τους ορίζοντες εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας.

## Θαλασσαιμία

Η β-θαλασσαιμία αποτέλεσε έναν από τους πρώτους στόχους της γονιδιακής θεραπείας από τη δεκαετία του '80.<sup>37,38</sup> Η προσθήκη και λειτουργία του φυσιολογικού γονιδίου της β-σφαιρίνης σε ένα σχετικά μικρό ποσοστό αιμοποιητικών κυττάρων των ασθενών θα μπορούσε να τους απαλλάξει από τον θαλασσαιμικό φαινότυπο.

Μετά από αρκετές δεκαετίες ερευνητικών προσπαθειών με επιτυχίες<sup>39</sup> αλλά και απογοητεύσεις, δύο κλινικές δοκιμές για τη β-θαλασσαιμία τρέχουν σήμερα (Νέα Υόρκη – Παρίσι/ΗΠΑ), ενώ αρκετές άλλες αναμένεται να ξεκινήσουν σύντομα, μια από αυτές και στην Ελλάδα. Το μεγαλύτερο πρόβλημα για τη γονιδιακή θεραπεία των θαλασσαιμικών συνδρόμων σχετίζεται με την ανεπαρκή αποτελεσματικότητα των ικών φορέων σφαιρίνης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η παραγωγή του σφαιρινικού mRNA σε θεραπευτικά επίπεδα απαιτεί τη χρήση ισχυρών ενισχυτών. Δυστυχώς οι ενισχυτές που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν πολύ μεγάλο μέγεθος με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο τίτλος παραγωγής των φορέων σε επίπεδο κλινικής κλίμακας και κατ'επέκταση και η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Ερευνα είναι σε εξέλιξη με στόχο να βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα αλλά και την ασφάλεια των φορέων σφαιρίνης με την παραγωγή νέας γενιάς φορέων σφαιρίνης με ενσωμάτωση μικρού μεγέθους, μονωτών χρωματίνης και ισχυρών ερυθροειδικών ενισχυτών που ταυτοποιούνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα με τεχνικές υψηλής απόδοσης.

Η γονιδιακή θεραπεία για τη θαλασσαιμία παρουσιάζεται σε ξεχωριστό άρθρο του παρόντος τεύχους.

Επιπλέον, υπάρχει μακροχρόνιο ερευνητικό ενδιαφέρον στην κατεύθυνση της επανενεργοποίησης της εμβρυικής γ-σφαιρίνης με στόχο να αντισταθμιστεί η ελλειμματική σύνθεση της β-σφαιρίνης στη θαλασσαιμία, ή να αναστα-

λεί η δρεπάνωση σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία.<sup>40,41</sup> Η ανακάλυψη του γονιδίου BCL11A ως μείζονος ρυθμιστή της καταστολής του γονιδίου της γ-σφαιρίνης σε συγκεκριμένο στάδιο κατά την ανάπτυξη, έδωσε μεγάλη ώθηση στο πεδίο αυτό καθώς επιτρέπει την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών.<sup>42,43</sup> Για παράδειγμα, η γονιδιακή διάρρηξη (disruption) του BCL11A με χρήση των zinc finger νουκλεασών αυξάνει σημαντικά την HbF τόσο σε φυσιολογικά όσο και θαλασσαιμικά CD34+ κύτταρα<sup>44</sup> και η έναρξη κλινικής μελέτης στη θαλασσαιμία με χρήση της τεχνολογίας της γονιδιακής διόρθωσης/στόχευσης αναμένεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

## Λευχαιμίες/Καρκίνος

Μέχρι σήμερα, ο καρκίνος είναι η συνηθέστερη νόσος-στόχος της γονιδιακής θεραπείας και συνιστά το 60% όλων των σε εξέλιξη κλινικών μελετών ανά τον κόσμο. Η γονιδιακή μεταφορά στοχεύει στη θεραπεία κακοήθων νόσων μέσω ποικίλων προσεγγίσεων, όπως τη δημιουργία T-κυττάρων με ειδικότητα έναντι αντιγόνων που εκφράζονται από τον όγκο, την ανάπτυξη εμβολίων έναντι του όγκου με έκφραση γονιδίων που ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, ή την ανάπτυξη των χιμαιρικών αντιγονικών υποδοχέων (chimeric antigen receptors-CARs) στα T-λεμφοκύτταρα, όπου μία μονήρης αλυσίδα αντισώματος με ειδικότητα έναντι αντιγόνου που εκφράζεται από κακοήθη κύτταρα συνδέεται με ενδοκυττάριο τμήμα που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση του γενετικά τροποποιημένου λεμφοκυττάρου όταν το αντίσωμα δεσμεύεται από το αντιγόνο-στόχο.<sup>45-47</sup>

Η χρήση T-λεμφοκυττάρων με CARs έναντι του CD19 και με ενσωμάτωση συνδιεγερτικής σηματοδότησης για τη θεραπεία ανθεκτικών Β-κακοήθειών (B-ALL, CLL) οδήγησε σε δραματικές μειώσεις του φορτίου των όγκων και αποτελεί μία από τις πιο πρόσφατες επιτυχίες της γονιδιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση αιματολογικών νόσων.<sup>48-51</sup>

Η χρήση των CARs σε αιματολογικά νοσήματα και η γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου ανασκοπούνται σε άρθρο του παρόντος τεύχους.

## Ιογενείς λοιμώξεις - AIDS

Οι ιογενείς λοιμώξεις παραμένουν μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η υιοθετούμενη μεταφορά ειδικών T-λεμφοκυττάρων έναντι ιών έχει χρησιμοποιηθεί ως στρατηγική πρόληψης και θεραπείας ιογενών λοιμώξεων σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Αρχικά, η παραγωγή αυτών των κυττάρων ήταν περίπλοκη και χρονοβόρα (10 εβδομάδες), στόχευε περιορισμένο φάσμα ιών και απαιτούσε χρήση ικών φο-

ρέων ή ιών για την παρουσίαση του αντιγόνου-στόχου καθώς και πολλαπλές σειρές καλλιέργειών.<sup>52-54</sup> Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που επιτρέπουν την ταχεία (εντός 10 ημερών) παραγωγή και ταυτόχρονη στόχευση μέχρι και 5 ιών (CMV, EBV, ADV, BK, HHV6) σε μονήρη καλλιέργεια και σε mini-βιοαντιδραστήρες με χρήση μίγματος πεπτιδίων των ιικών αντιγόνων.<sup>55</sup> Αυτά τα, έναντι ιών, ειδικά λεμφοκύτταρα πληρούν τις απαιτήσεις της πολλαπλής ειδικότητας, ταχείας παραγωγής και παρατεταμένης και ευρείας αντικής δραστηριότητας σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και έχουν δώσει εντυπωσιακά αποτελέσματα σε περιπτώσεις αναζωπύρωσης από, ή λοίμωξης με CMV, EBV, ADV, BK, HHV6 σε ασθενείς μετά από αλλογενή μεταμόσχευση<sup>55</sup>.

Η παραγωγή και αποτελεσματικότητα των T-λεμφοκυττάρων πολλαπλής ειδικότητας έναντι ιών, μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, παρουσιάζεται σε ξεχωριστό άρθρο του παρόντος τεύχους.

Η γονιδιακή θεραπεία αιμοποιητικών κυττάρων αποτελεί και για το AIDS μια θεραπευτική προσέγγιση για πιθανή ίαση. Είναι γνωστό ότι άτομα με απαλείψεις στο γονίδιο CCR5, το γονίδιο που εκφράζει έναν κυτταρικό συνυποδοχέα του ιού HIV, είναι ανθεκτικά σε λοίμωξη από τον ιό.<sup>56</sup> Αν αυτό το γονίδιο απαλειφθεί από τα T-λεμφοκύτταρα ενός ατόμου προσβεβλημένου από τον ιό, θα δημιουργηθεί ένας πληθυσμός ανθεκτικών στον HIV T-λεμφοκυττάρων, που πρακτικά θα έχει ως αποτέλεσμα την ίαση της νόσου. Αυτή η απαλείψη είναι δυνατό να επιτευχθεί με τη μέθοδο του gene editing (γονιδιακή διόρθωση/στόχευση).<sup>57</sup> Η μέθοδος αυτή της γενετικής μηχανικής χρησιμοποιεί τεχνητές νουκλεάσες (μοριακά σχεδιασμένες, γνωστές και ως 'μοριακά ψαλίδια') που μπορούν να προσθέσουν, να αντικαταστήσουν ή να απαλείψουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA από ένα γονίδιο. Μια πολυκεντρική κλινική μελέτη που διεξάγεται σήμερα στις Η.Π.Α και που χρησιμοποιεί την τεχνική του gene editing στα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με AIDS έχει πρόσφατα ανακοινώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα.<sup>58</sup> Επιπλέον, πολλά κέντρα έχουν εστιάσει στην προσπάθεια ανάπτυξης γονιδιακής θεραπείας για συγκεκριμένες λοιμώδεις νόσους, όπως π.χ. για την ηπατίτιδα C.

Η γονιδιακή διόρθωση/στόχευση, ως η μετεξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας για ποικιλία νόσων-στόχων, παρουσιάζεται σε ξεχωριστό άρθρο του παρόντος τεύχους.

## Γονιδιακή θεραπεία αυτοκτονίας στην απλοταυτόσημη μεταμόσχευση HSCs

Η ρύθμιση της αλλοαντιδραστικότητας στο πλαίσιο αλλογενούς μεταμόσχευσης HSCs, με στόχο να διαχωριστεί η επωφελής δράση του μοσχεύματος έναντι της κακοήθειας (graft versus tumor/leukemia GVT/GVL) και των λοιμώξεων (graft versus infection-GVI) από την

επιβλαβή νόσο μοσχεύματος κατά ξενιστή (graft versus host disease-GvHD), παραμένει σταθερή πρόκληση. Η γονιδιακή θεραπεία με την εισαγωγή γονιδίου αυτοκτονίας (suicide gene therapy) στα λεμφοκύτταρα του δότη πριν τη μεταμόσχευση και τη σταδιακή έγχυσή τους στο λήπτη μετά τη μεταμόσχευση, λειτουργεί ως διακόπτης ασφάλειας: επιτρέπει ταχεία ανοσολογική αποκατάσταση με επαρκή έλεγχο των λοιμώξεων και μειώνει την πιθανότητα υποτροπής ενώ επιφέρει επιλεκτική εξάλειψη των T-λεμφοκυττάρων επί εμφανίσεως GvHD. Δύο συστήματα αυτοκτονίας έχουν ελεγχθεί σε κλινικές μελέτες απλοταυτόσημης μεταμόσχευσης: το ένα, χρησιμοποιεί ιικό φορέα που κωδικοποιεί το γονίδιο της θυμινικής κινάσης (TK) και η εξάλειψη των λεμφοκυττάρων γίνεται με χορήγηση του αντικικού φαρμάκου Ganciclovir (San Raffaele, Milan)<sup>59,60</sup> και το άλλο, το γονίδιο της κασπάσης-9 που επάγει διμερισμό παρουσία του παράγοντα διμερισμού AP1903 οδηγώντας σε απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων που προκαλούν GvHD (Baylor, Houston).<sup>61</sup> Και οι δύο μελέτες έδωσαν εντυπωσιακά αποτελέσματα στον αποτελεσματικό έλεγχο της οξείας GvHD (100%). Επιπλέον, η μελέτη TK-007 δημοσίευσε ποσοστά θνητότητας μη σχετιζόμενης με υποτροπή στους ασθενείς που πέτυχαν ανοσολογική αποκατάσταση 14% έναντι 60% αυτών που δεν αποκαταστάθηκαν ανοσολογικά καθώς και κατάργηση της όψιμης θνητότητας από λοιμογόνα αίτια που παρατηρείται στην κλασική απλοταυτόσημη μεταμόσχευση με αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων. Το ποσοστό συνολικής επιβίωσης ήταν 41% στους ασθενείς της μελέτης με προχωρημένη νόσο έναντι 62% των ασθενών που υποβάλλονται σε κλασική απλοταυτόσημη μεταμόσχευση με αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων και σε φάση προχωρημένης νόσου, όπως καταγράφηκε σε αναδρομική μελέτη του EBMT.<sup>60,62</sup>

Τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν τη βάση για το σχεδιασμό και διεξαγωγή της διεθνούς, τυχαίοποιημένης, και πρώτης φάσης III, μελέτης γονιδιακής θεραπείας (TK-008), σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου οξεία λευχαιμία που υποβάλλονται σε απλοταυτόσημη μεταμόσχευση. Οι ασθενείς τυχαίοποιούνται (3:1) να λάβουν back up εγχύσεις TK-λεμφοκυττάρων του δότη μετά από απλοταυτόσημη μεταμόσχευση με αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων έναντι αυτών που υποβάλλονται σε T-depleted απλοταυτόσημη μεταμόσχευση με αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων ή T-repleted απλοταυτόσημη μεταμόσχευση με υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης μετά την έγχυση του μοσχεύματος.

## Μη-αιματολογικές νόσοι

Ιδιαίτερα εντυπωσιακή είναι η πρόοδος στη γονιδιακή θεραπεία στην οφθαλμολογία και ορόσημο υπήρξε το κλινικό αποτέλεσμα της γονιδιακής μεταφοράς με χρή-

ση AAV φορέα στη συγγενή αμαύρωση Leber, τύφλωση κληρονομικής μορφής όπου οι φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς λόγω ενός παθολογικού RPE65 γονιδίου εκφυλίζονται στη γέννηση ή σύντομα μετά, και ο αμφιβληστροειδής αντικαθίσταται από ουλώδη ιστό όσο προχωράει η νέκρωση των φωτοϋποδοχέων. Αρχικά, σε 3 ασθενείς 19-26 ετών ενέθηκαν, σε πολλαπλά σημεία υποαμφιβληστροειδικά, AAV-2 φορείς που κωδικοποιούν το RPE65 γονίδιο. Οι ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση στην όραση χωρίς τοπικές ή συστηματικές παρενέργειες από τους ορολογικούς τύπου-2 AAV φορείς. Όταν αργότερα συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη νεότεροι ασθενείς, το αποτέλεσμα ήταν πραγματικά εντυπωσιακό: ένα οκτάχρονο παιδί αποκατέστησε σχεδόν πλήρως την όρασή του και μαζί τη δυνατότητα να ζήσει μια φυσιολογική ζωή.<sup>63,64</sup> Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της πρώιμης αντιμετώπισης με γονιδιακή ή άλλη αναγεννητική θεραπεία, σε φάση όπου η λειτουργική ανάκαμψη μπορεί να είναι ακόμη εφικτή και σε ασθενείς όπου το κλινικό όφελος είναι πιθανό άρα και πιο προβλέψιμη η αποτελεσματικότητα ή ακόμη και η ασφάλεια μιας νέας τεχνολογίας.

Μια παρόμοια προσέγγιση χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας.<sup>65</sup> Η ανάμειξη της βιομηχανίας σε αυτόν τον τομέα μπορεί να εγγυηθεί τις απαραίτητες τεχνολογικές βελτιώσεις για την παραγωγή φορέων σε κλινική κλίμακα, γεγονός το οποίο θα οδηγήσει σε ευρεία εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας σε διάφορες μορφές τύφλωσης.

Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί και σε νευρολογικά νοσήματα και πρόσφατα ανακοινώθηκε η κινητική βελτίωση ασθενών με προχωρημένη νόσο Parkinson που υποβλήθηκαν σε γονιδιακή θεραπεία με ενδοεγκεφαλική χορήγηση λεντιικού φορέα.<sup>66</sup>

Ο πίνακας 1 περιέχει μια περιληπτική σύνοψη κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας για διάφορες νόσους οι οποίες έχουν δημοσιευτεί (πολλές κλινικές μελέτες που διεξάγονται από εταιρίες δεν έχουν δημοσιευτεί).

## Γονιδιακή διόρθωση:

### Το μέλλον της γονιδιακής θεραπείας;

Η ιδεώδης μορφή της γονιδιακής θεραπείας με *in situ* διόρθωση της γονιδιακής βλάβης (gene editing), αντί της γονιδιακής προσθήκης (gene addition) όπως κλασικά εφαρμόζεται σήμερα, κερδίζει έδαφος τα τελευταία χρόνια και κάποιες κλινικές δοκιμές ξεκίνησαν (π.χ. στην αντιμετώπιση του ιού HIV<sup>58,67</sup> ή του γλοιοβλαστώματος), ή αναμένεται σύντομα να ξεκινήσουν. Η τεχνολογία αυ-

τή, που από κάποιους αποκαλείται και 'γονιδιοματική χειρουργική',<sup>68</sup> επιτρέπει αποτελεσματική και ακριβή γενετική τροποποίηση μέσω επαγωγής θραύσης στη διπλή έλικα σε προεπιλεγμένο στόχο στο γονιδίωμα με τη χρήση υβριδικών νουκλεασών (zing-finger νουκλεάσες, meganucleases και transcription activator-like effector νουκλεάσες). Το δυνητικό αποτέλεσμα αυτής της θραύσης και της επιδιόρθωσης που ακολουθεί μπορεί να είναι: i) η γονιδιακή διάρρηξη (gene disruption) που καταργεί τη λειτουργία γονιδίων και είναι επιθυμητή στην περίπτωση γονιδίων που εμπλέκονται στην παθολογία μιας νόσου (π.χ. CCR5 για τη θεραπεία του HIV), ii) η γονιδιακή διόρθωση (gene correction) επί ταυτόχρονης παρουσίας ομόλογης, προς το γονίδιο-στόχο, ακολουθίας DNA που επιτρέπει σε ένα γονίδιο να εκφραστεί στη φυσιολογική χρωμοσωμική του θέση και στοχεύει στη θεραπεία των μονογονιδιακών νόσων (δρεπανοκυτταρική αναιμία, αιμοφιλία, ανοσοανεπάρκειες), iii) η γονιδιακή εισχώρηση (DNA insertion) ενός φυσιολογικού αντιγράφου γονιδίου σε προεπιλεγμένη, «ασφαλή» θέση στο γονιδίωμα που αποτελεί επιθυμητό στόχο για όλες τις εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας σε αρχέγονα κύτταρα.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της αυτής νέας τεχνολογίας σε σχέση με την κλασική γονιδιακή θεραπεία που χρησιμοποιεί γονιδιακή προσθήκη, είναι το ασφαλέστερο προφίλ της, καθώς η ενσωμάτωση γενετικού υλικού είναι στοχευμένη και όχι τυχαία, αποτρέποντας έτσι τον κίνδυνο εισχωρητικής ογκογένεσης.

## Συμπεράσματα

Τα κλινικά οφέλη που επιτεύχθηκαν με διαφορετικές προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας υποστηρίζουν ισχυρά ότι η γονιδιακή θεραπεία έχει πλέον ξεπεράσει το στάδιο της απόδειξης της αρχής (proof of principle) ότι μπορεί να αποδώσει μακροχρόνια, δυνητικά θεραπευτικά αποτελέσματα και αποτελεί ρεαλιστική προσέγγιση για αρκετές, προηγουμένως ανίατες ή δυσίατες με τη συμβατική ιατρική, κλινικές περιπτώσεις. Το μάθημα που κερδήθηκε από την επιπλοκή της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης οδήγησε σε νέες γενιές φορέων, σε σχεδιασμό κλινικών πρωτοκόλλων προσαρμοσμένων στις ιδιαιτερότητες της νόσου-στόχου και σε βελτιώσεις στην παρασκευή των φορέων σε κλινική κλίμακα, ανοίγοντας τελικά το δρόμο για ευρύτερες εφαρμογές της τρέχουσας τεχνολογίας. Ταυτόχρονα, σηματοδότησε την ανάγκη ανάπτυξης της γονιδιακής διόρθωσης/στόχευσης ως την επόμενη κατάκτηση του πεδίου της γονιδιακής θεραπείας.

Πίνακας 1	Γενετική νόσος	Έτος δημοσίευσης	Γονιδιακή μεταφορά (φορέας/ διαγονιδια)	Χώρα/τόπος διεξαγωγής/ χορηγός	Αποτελέσματα	Σχόλια	Βιβλιογραφική αναφορά
Ανοσοανεπάρκεια X-SCID	2000 2011	γ-retrovirus (IL2RG) σε αυτόλογα HSCs	(N=20) Γαλλία Αγγλία	Μακρόχρονη αποκατάσταση Φυσιολογική ανάπτυξη ασθενών	Follow up 16 ετών : 19/20 εν ζώη T-λεμφοβλαστική λευχαιμία :5/20 (ύφεση με χημειοθεραπεία/ μεταμόσχευση- 1 θάνατος)	(12,72) (73)	
Ανοσοανεπάρκεια ADA-SCID	2002 2011	γ-retrovirus (ADA) σε αυτόλογα HSCs	(N=20) Ιταλία Αγγλία	Μακρόχρονη ανοσολογική αποκατάσταση, διόρθωση μεταβολικών διαταραχών	Χωρίς λευχαιμογένεση	(14) (74)	
Wiskott-Aldrich	2010 2013	γ-retrovirus, γονίδιο WASP σε αυτόλογα HSCs Lentivirus, γονίδιο WASP σε αυτόλογα HSCs	Γερμανία (N=10) Ιταλία (N=3)	Ανοσολογική αποκατάσταση, υποχώρηση ευκαιριακών λοιμώξεων και εκζέματος	Λευχαιμία (6/10) Πολυκλωνική αιμοποίηση	(19) (34)	
X-φυλοσύνδετη αδρενολευκοδυστροφία	2009	Lentivirus (ABCD1) σε αυτόλογα HSCs	Γαλλία (N=4)	Διακοπή της εγκεφαλικής απομυελίνωσης, βελτίωση της νευρολογικής συμπτωματολογίας	Πολυκλωνική αιμοποίηση	(35)	
Μεταχρωματική Λευκοδυστροφία	2013	Lentivirus, γονίδιο ARSA σε αυτόλογα HSCs	Ιταλία (N=3)	Διακοπή πρόοδου νόσου	Πολυκλωνική αιμοποίηση	(36)	
β-θαλασσαιμία	2010 2013	Lentivirus (β-globin) (SIN, insulated, σε αυτόλογα HSCs) Lentivirus (β-globin) (SIN, σε αυτόλογα HSCs)	Γαλλία (Blue Bird Bio) (N=3) Γαλλία, ΗΠΑ (Blue Bird Bio) (N=2)	Μακρόχρονη απεξάρτηση (>6έτη) από μεταγγίσεις σε 1 από 3 ασθενείς Πρώιμη απεξάρτηση (1 <sup>ος</sup> μήνας) από μεταγγίσεις και στους 2 ασθενείς	Κλωνική έκπτωση λόγω ενσωμάτωσης στο γονίδιο HMG2 / β <sup>ο</sup> /β <sup>ε</sup> θαλασσαιμία β <sup>ο</sup> /β <sup>ε</sup> θαλασσαιμία / μικρό follow up	(39) EHA 2014	
Αιμορροφιλία Β	2011	AAV8 (FIX) i.v.	ΗΠΑ/Αγγλία (N=6)	Βελτίωση αιμορραγικής διάθεσης, αυξημένα διαστήματα μεταξύ εγχύσεων FIX ή/και πλήρης διακοπή προφυλακτικών εγχύσεων	Μικρή δόση κορτικοειδών για καταστολή των αντι-AAV ανοσολογικών αντιδράσεων και διατήρηση μακρόχρονης έκφρασης	(29)	
Ανεπάρκεια λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Glybera)	2008	Glybera (2013 marketed) rAAV1 LPL <sup>S447X</sup>	Ολλανδία	Μείωση τριγλυκεριδικού περιεχομένου χυλομικρών Ηπιότερη παγκρεατίτιδα / κολιακό άλγος		(69,70)	
Υποτροπιζούσα Β-ALL	2013 2013	Lentivirus, T-cells CD19 chimeric antigen receptor (CAR)	Νέα Υόρκη (N=5) Πενσυλβανία (N=2)	Πλήρης ύφεση σε όλους τους ασθενείς (ανθεκτικοί σε προηγούμενες θεραπείες) Μία υποτροπή μετά από 3 μήνες / 4 κατάφεραν να κάνουν allo-HSCT CR και στους 2, 1 υποτροπίασε μετά από 2 μήνες, 1 παραμένει σε CR για 11 μήνες	Γέφυρα για σε χημειοανθεκτική νόσο Σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκινών Λεμφοπενία	(49) (50)	



<b>Πίνακας 1 (συνέχεια)</b>						
Γενετική νόσος	Έτος δημοσίευσης	Γονιδιακή μεταφορά (φορέας/ διαγονίδιο)	Χώρα/τόπος διεξαγωγής/ χορηγός	Αποτελέσματα	Σχόλια	Βιβλιογραφική αναφορά
Υποτροπιζούσα CLL και Λεμφώματα	2011 2013	Lentivirus, αυτόλογα T-κύτταρα CD19-CAR Lentivirus, αλλογενή T-κύτταρα CD19-CAR	Πενσυλβανία (N=1) ΗΠΑ (National Cancer Institute) (N=10)	Παραμένει σε CR 10 μήνες Ύφεση νόσου σε 3 ασθενείς	Σύνδρομο λύσης όγκου χωρίς GvHD	(76) (51)
Ανοσολογική αποκατάσταση και έλεγχος GvHD μετά από T-cell depleted haplo-HSCT	2009 2011	γ-retrovirus (TK) σε λεμφοκύτταρα του δότη γ-retrovirus (iCasp-9) σε λεμφοκύτταρα του δότη	Ιταλία, Αγγλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ισραήλ (N=45) ΗΠΑ (Houston, Texas) (N=5)	14% non-relapse θνητότητα στους ασθενείς με ανοσολογική αποκατάσταση, 100% GvHD control 100% GvHD control	Γονίδιο HSV-TK /περιορίζει τη δυνατότητα χρήσης Ganciclovir στην HSCT Ανθρώπινης προέλευσης γονίδιο αυτοκτονίας	(60) (61)
AIDS	2013	Ad5/35-CCR5-ZFN, T-κύτταρα	Πενσυλβανία, ΗΠΑ (Sangamo Καλιφόρνια) (N=12)	Μερική επαγωγή γενετικής αντίστασης στον HIV		(67,57)
Συγγενής αιμόρωση Leber τύπου 2	2009	rAAV2 (RPE65) Έγχυση υπο-αμφιβληστροειδικά	(N=17) Αγγλία Πενσυλβανία Φλόριδα (ΗΠΑ) Ιταλία	Βελτίωση/Αποκατάσταση όρασης σε παιδιά και ενήλικες	follow up 3 χρόνων: Σταθερή βελτίωση όρασης	(63, 64,71)
Ηλικιακή εκφύλιση ωχράς	2012	rAAV2 (Flt-1-VEGF αναστολέας) Έγχυση ενδοφθαλμικά (υαλοειδές)	Εταιρεία Genzyme	Διακοπή της νεοαγγειογένεσης	Εν αναμονή δημοσίευσης σημαντικών αποτελεσμάτων	(65)
Νόσος Parkinson	2011 2014	AAV2 (GAD) Αμφιστερόπλευρα στους υποθαλαμικούς πυρήνες	ΗΠΑ (N=45) Αγγλία, Γαλλία (Oxford BioMedica) (N=15)	Κινητική βελτίωση ασθενών (motor scores)		(75) (66)

## The development of gene therapy

by Evangelia Y annaki<sup>1,2</sup>, Varnavas Constantinou<sup>1</sup>, George Stamatoyannopoulos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gene and Cell Therapy Center, Haematology Department and Bone Marrow Transplantation Unit, "G. Papanikolaou" Hospital, Thessaloniki, Greece <sup>2</sup>Department of Medicine and Markey Molecular Medicine Center, University of Washington, Seattle, WA, USA

**ABSTRACT** The aetiologic treatment of diseases at the genetic level is called gene therapy and it has been a theoretical objective of medicine since the '70s, when genetic diseases were directly associated to gene mutations. In the '80s, the first experimental approaches for gene therapy had to address two basic issues: the development of tools (vectors) to transfer the therapeutic genetic material into the cells and the type of cells to be targeted. In the early '90s, following the tremendous progress of biotechnology, gene therapy moved to the level of clinical trials, albeit without the expected success. This lack of efficacy indicated the need of return back to basic research and rational design of clinical protocols. The first great success of gene therapy came in 2000, when children suffering from X-SCID, a lethal immunodeficiency, were cured with the use of a gamma retroviral vector for the transfer of the therapeutic gene to the hematopoietic stem cells. This indisputable success of gene therapy, however, was overshadowed by the recognition of treatment-associated toxicity in the form of insertional oncogenesis, which necessitated the development of new and safer vectors or even new methods for the genetic modification. Today, hundreds of clinical trials are conducted worldwide for difficult to cure, both hereditary and acquired diseases, using safer and more efficient viral vectors (lentiviral, AAV vectors) and producing remarkable results in many cases. Moreover, the field of gene therapy is constantly expanding; gene editing, a method which offers targeted and theoretically safer genetic modification opening the door to a range of novel therapeutic approaches, is expected to be the next advancement of gene therapy. This review presents a historical overview of gene therapy, with emphasis on important and seminal points of its development and evolution.

## Βιβλιογραφία

1. Shimotohno K, Temin HM. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell*. 1981;26(1 Pt 1):67-77.
2. Joyner A, Keller G, Phillips RA, Bernstein A. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature*. 1983;305:556-558.
3. Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG, Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 1984;310:476-480.
4. Dai Y, Schwarz EM, Gu D, et al. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:1401-1405.
5. Hareendran S, Balakrishnan B, Sen D, et al. Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. *Rev Med Virol*. 2013;23:399-413.
6. O'Reilly M, Kohn DB, Bartlett J, et al. Gene therapy for rare diseases: summary of a National Institutes of Health workshop, September 13, 2012. *Hum Gene Ther*. 2013;24:355-362.
7. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270:475-480.
8. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science*. 1995;270:470-475.
9. Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med*. 1995;1:1017-1023.
10. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12133-12138.
11. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80:148-158.
12. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-672.
13. Bousso P, Wahn V, Douagi I, et al. Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived in vivo from a single human T cell precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:274-278.
14. Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296:2410-2413.
15. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency.

- N Engl J Med. 2009;360:447-458.
16. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* 2006;12:401-409.
  17. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008;118:3132-3142.
  18. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest.* 2008;118:3143-3150.
  19. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med.* 2010;363:1918-1927.
  20. Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med.* 2014;6:227ra33.
  21. Schröder AR, Shinn P, Chen H, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110:521-529.
  22. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science.* 2003;300:1749-1751.
  23. Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest.* 2009;119:964-975.
  24. Zhou S, Mody D, DeRavin SS, et al. A self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy that does not activate LMO2 expression in human T cells. *Blood.* 2010;116:900-908.
  25. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med.* 1999;5:56-63.
  26. Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM, et al. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3906-3910.
  27. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006;12:342-347.
  28. Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther.* 2006;14:452-455.
  29. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2011;365:2357-2365.
  30. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2010;363:355-364.
  31. Seymour LW, Thrasher AJ. Gene therapy matures in the clinic. *Nat Biotechnol.* 2012;30:588-593.
  32. Mukherjee S, Thrasher AJ. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *Gene.* 2013;525:174-181.
  33. van der Loo JC, Swaney WP, Grassman E, et al. Scale-up and manufacturing of clinical-grade self-inactivating  $\gamma$ -retroviral vectors by transient transfection. *Gene Ther.* 2012;19:246-254.
  34. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science.* 2013;341:1233151.
  35. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science.* 2009;326:818-823.
  36. Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.* 2013;341:1233158.
  37. Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley TJ. Advances in thalassemia research. *Blood.* 1984;63:738-758.
  38. Anderson WF, Goldberg S, Kantoff P, et al. Attempts at gene therapy in beta-thalassemic mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;445:445-451.
  39. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature.* 2010;467:318-322.
  40. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood.* 2011;117:3945-3953.
  41. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:a011643.
  42. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322:1839-1842.
  43. Xu J, Peng C, Sankaran VG, et al. Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. *Science.* 2011;334:993-996.
  44. Reik A, Chang KH, Stehling-Sun S, et al. Targeted gene modification in hematopoietic stem cells: A potential treatment for thalassemia and sickle cell anemia. *Blood ASH 2013 abstr 434.*
  45. Stroncek DF, Berger C, Cheever MA, et al. New directions in cellular therapy of cancer: a summary of the summit on cellular therapy for cancer. *J Transl Med.* 2012;10:48.
  46. June C, Rosenberg SA, Sadelain M, Weber JS. T-cell therapy at the threshold. *Nat Biotechnol.* 2012;30:611-614.
  47. Chang YH, Connolly J, Shimasaki N, et al. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res.* 2013;73:1777-1786.
  48. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011;3:95ra73.
  49. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2013;5:177ra38.
  50. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368:1509-1518.
  51. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, et al. Donor-

- derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;122:4129-4139.
52. Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med*. 1994;331:679-680.
  53. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006;12:1160-1166.
  54. Leen AM, Christin A, Myers GD, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114:4283-4292.
  55. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of Broad-Spectrum T Cells as Treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 Infections after HSCT. *Sci Transl Med*. 2014;6:242ra83.
  56. Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360:692-698.
  57. Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008;26:808-816.
  58. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370:901-910.
  59. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*. 1997;276:1719-1724.
  60. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol*. 2009;10:489-500.
  61. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365:1673-1683.
  62. Ciceri F, Labopin M, Aversa F, et al. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood*. 2008;112:3574-3581.
  63. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008;358:2240-2248.
  64. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374:1597-1605.
  65. Maclachlan TK, Lukason M, Collins M, et al. Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Mol Ther*. 2011;19:326-334.
  66. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*. 2014;383:1138-1146.
  67. Maier DA, Brennan AL, Jiang S, Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. *Hum Gene Ther*. 2013;24:245-258.
  68. Rahman SH, Maeder ML, Joung JK, Cathomen T. Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Hum Gene Ther*. 2011;22:925-933.
  69. Stroes ES, Nierman MC, Meulenber JJ, et al. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2303-2304.
  70. Carpentier AC, Frisch F, Labbé SM, et al. Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:1635-644.
  71. Testa F, Maguire AM, Rossi S, et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology*. 2013;120:1283-1291.
  72. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2010;363:355-364.
  73. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, et al. Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*. 2011;3:97ra79.
  74. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med*. 2011;3:97ra80.
  75. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*. 2011;10:309-319.
  76. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365:725-733.