

Γονιδιακή θεραπεία για τη θαλασσαιμία

Γαρυφαλιά Καρπώνη¹, Ευαγγελία Γιαννάκη^{1,2}

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Η β-θαλασσαιμία αποτελεί τη συχνότερη μονογονιδιακή διαταραχή παγκοσμίως και προκύπτει από την πλήρη απουσία ή τη σημαντικά μειωμένη σύνθεση β-σφαιρίνης. Η συμβατική θεραπεία με χρόνιες μεταγγίσεις και καθημερινή αποσιδήρωση έχουν μεν βελτιώσει εντυπωσιακά το προσδόκιμο επιβίωσης, αλλά η συμμόρφωση στη θεραπεία επιβαρύνει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και τις εθνικές οικονομίες με ένα τεράστιο οικονομικό βάρος. Ως αποτέλεσμα της μη συμμόρφωσης στη θεραπεία, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν σοβαρές επιπλοκές. Η αυτόλογη μεταμόσχευση γενετικά διορθωμένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34⁺) που καλείται γονιδιακή θεραπεία (ΓΘ), αποτελεί μία ελπιδοφόρα θεραπευτική στρατηγική που προσδοκά να απαλλάξει τους ασθενείς από την ανάγκη ισόβιων μεταγγίσεων και αποσιδήρωσης. Αντίθετα με την αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, η ΓΘ αποτελεί θα είναι διαθέσιμη σε όλους τους ασθενείς, χωρίς ανάγκη ανεύρεσης συμβατού δότη και χωρίς την πιθανότητα εμφάνισης σοβαρών ανοσολογικών επιπλοκών. Πριν την έναρξη ΓΘ για τη θαλασσαιμία σε κλινικό επίπεδο, μεσολάβησαν πολλά χρόνια προκλινικής έρευνας για βελτιστοποίηση των συνθηκών και των μέσων γονιδιακής μεταφοράς. Μέχρι σήμερα, τρεις κλινικές μελέτες ΓΘ για τη β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο έχουν πραγματοποιηθεί ή είναι σε εξέλιξη και έχει δημοσιευθεί ή ανακοινωθεί η ανεξάρτητη από μεταγγίσεις τριών ασθενών με β⁰/β^E θαλασσαιμία. Ωστόσο, ο σχεδιασμός κλινικών πρωτοκόλλων ΓΘ για αιμοσφαιρινοπάθειες εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζητήσεων. Συγκεκριμένα, συζητήσεις και έρευνα σχετικά με το βέλτιστο μέγεθος έντασης του προπαρασκευαστικού σχήματος, τη δόση των γενετικά διορθωμένων CD34⁺ κυττάρων που πρέπει να χορηγηθούν, τη βέλτιστη πηγή αυτόλογου μοσχεύματος, περαιτέρω βελτιώσεις των φορέων β-σφαιρίνης και κυρίως την ανάγκη ή όχι πρόσθετων μέτρων ασφάλειας της διαδικασίας (σε βάρος της αποτελεσματικότητας) για τη θαλασσαιμία, εξηγούν γιατί η θεραπεία της θαλασσαιμίας εξακολουθεί να αποτελεί συνεχιζόμενη πρόκληση στο πεδίο της ΓΘ των γενετικών νοσημάτων. Στην ανασκόπηση που ακολουθεί θα αναπτυχθούν οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για επιτυχή ΓΘ στη θαλασσαιμία, η δύσκολη πορεία της ΓΘ για τις αιμοσφαιρινοπάθειες μέχρι να φθάσει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, η γνώση που αποκτήθηκε από τις πρώτες κλινικές μελέτες και οι προβληματισμοί και προκλήσεις που εξακολουθούν να υπάρχουν. Συνολικά, μετά από αρκετές δεκαετίες ερευνητικών προσπαθειών, απογοητεύσεων αλλά και επιτυχιών, ο δρόμος για τη ΓΘ των ασθενών με θαλασσαιμία άνοιξε και είναι πολλά υποσχόμενος.

Haema 2016; 7(1): 81-91 Copyright EAE

Εισαγωγή

Παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας

Η β-θαλασσαιμία αποτελεί τη συνηθέστερη μονογονι-

διακή διαταραχή παγκόσμια και είναι ένα από τα πρώτα νοσήματα που αποτέλεσαν στόχο της γονιδιακής θεραπείας (ΓΘ). Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο ή στα ρυθμιστικά στοιχεία που εδράζονται στον γενετικό τόπο της β-σφαιρίνης που οδηγούν σε ελλειμματική ή τροποποιημένη παραγωγή β-σφαιρινικών αλυσίδων και κατά συνέπεια σε ανισόρροπη παραγωγή των β-έναντι των α-σφαιρινικών αλυσίδων, ενδοκυττάρια καθίζηση των α-σφαιρινικών αλυσίδων που βρίσκονται σε περίσσεια, και τελικά μη αποδοτική ερυθροποίηση. Οι ετεροζυγώτες θαλασσαιμικοί είναι ασυμπτωματικοί με ήπια

¹Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική Κλινική-Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών, Νοσοκομείο Γεώργιος Παπανικολάου, Θεσσαλονίκη

²Department 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

αναιμία, ωστόσο η ομοζυγωτία, που συνιστά τη βαριά μορφή της νόσου, (μειζών β-θαλασσαιμία), χαρακτηρίζεται είτε από παντελή έλλειψη HbA (β⁰-θαλασσαιμία), είτε από μερική παραγωγή της (β⁺-θαλασσαιμία). Οι ασθενείς αναπτύσσουν σοβαρή αναιμία στους 6-9 μήνες από τη γέννηση, οπότε και ολοκληρώνεται η μετάβαση από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) στην ενήλικη αιμοσφαιρίνη HbA, και παραμένουν μεταγγισιοεξαρτώμενοι εφ' όρου ζωής.¹

Τρέχουσες θεραπείες και η ανάγκη για γονιδιακή θεραπεία της θαλασσαιμίας

Οι επαναλαμβανόμενες μεταγγίσεις και η τακτική αποσιδήρωση ως μέσο συμπτωματικής αντιμετώπισης της νόσου, έχουν αυξήσει σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης των θαλασσαιμικών ασθενών τα τελευταία 40 χρόνια. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική επιβάρυνση στην ποιότητα ζωής των πασχόντων με αποτέλεσμα κακή συμμόρφωσή τους στη θεραπεία καθώς και ένα εξαιρετικά μεγάλο θεραπευτικό κόστος για τις εθνικές οικονομίες, ιδιαίτερα των αναπτυσσόμενων χωρών.² Η μη συμμόρφωση στη θεραπεία προκαλεί δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές (καρδιακή ανεπάρκεια, ηπατική κίρρωση).

Η μόνη διαθέσιμη ριζική θεραπεία της β-θαλασσαιμίας είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών (allo-HCT) από συμβατό αδελφό δότη, με υψηλά ποσοστά επιτυχίας (80-90%) σε ασθενείς <17 ετών τάξεως I και II κατά Pesaro.³ Ωστόσο, η θεραπευτική δυνατότητα της αλλογενούς μεταμόσχευσης περιορίζεται από την περιορισμένη διαθεσιμότητα ιστοσυμβατού δότη, την ανάγκη μακροχρόνιας λήψης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, το σχετικά περιορισμένο εύρος εφαρμογής σε νεότερους ηλικιακά ασθενείς και την αυξημένη θνητότητα και νοσηρότητα σε μεγαλύτερους ασθενείς τάξεως III κατά Pesaro⁴ λόγω των ανοσολογικών επιπλοκών (νόσος μοσχεύματος κατά ξενιστή και απόρριψη) και της μη σχετιζόμενης με απόρριψη θνητότητας. Επιπρόσθετα, μεταμοσχεύσεις από εναλλακτικούς δότες, όπως οι συμβατοί μη συγγενείς ή οι απλοταυτόσημοι δότες παραμένουν σε μεγάλο βαθμό υπό έρευνα καθώς σχετίζονται με σημαντικά μικρότερη επιβίωση ελεύθερη νόσου (21-70%) και υψηλότερη νοσηρότητα και θνητότητα (25-30%).⁵⁻⁷

Η γονιδιακή θεραπεία, με την εισαγωγή ενός φυσιολογικού αντιγράφου του β-γονιδίου στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) του ασθενούς, θα επανεγκαταστήσει αποτελεσματική παραγωγή αιμοσφαιρίνης. Κατά συνέπεια, θα απαλλάξει τους ασθενείς από την εξάρτηση των μεταγγίσεων προσφέροντας δυνατότητα ίασης σε εκείνους που στερούνται ενός ιατρικά αποδεκτού δότη ή είναι υψηλού κινδύνου για να υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση, χωρίς τον κίνδυνο των ανοσολογικών επιπλοκών της αλλογενούς μεταμόσχευσης και χωρίς να

απαιτείται ανοσοκαταστολή για να προληφθούν ή αντιμετωπιστούν αυτές οι επιπλοκές.

Προϋποθέσεις για επιτυχή γονιδιακή θεραπεία της θαλασσαιμίας

Η *in situ* ομόλογη διόρθωση του προβληματικού β-γονιδίου με τη ΓΘ αν και θα ήταν ιδεώδης προσέγγιση, δεν είναι ακόμη εφικτή στα HSCs. Αντί αυτής, η γονιδιακή προσθήκη με μεταφορά του φυσιολογικού β- ή γ-γονιδίου μέσω ιικού φορέα και η ενσωμάτωσή του στο χρωμοσωμικό υλικό των HSCs παραμένει ως η στρατηγική επιλογής.

Ωστόσο, η πολυπλοκότητα της ρύθμισης της έκφρασης σε υψηλά επίπεδα του φυσιολογικού γονιδίου, η ανάγκη ιστοειδικότητας της έκφρασης και η υψηλή ασφάλεια της διαδικασίας όπως απαιτείται για ένα χρόνιο νόσημα με γενικά καλοήγητη πορεία απέτελεσαν μείζονες προκλήσεις για σχεδόν δύο δεκαετίες και καθυστέρησαν σημαντικά την έναρξη κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας για τη θαλασσαιμία.

Λειτουργικοί φορείς

Ιικοί φορείς κατάλληλοι για τη γονιδιακή θεραπεία της θαλασσαιμίας θεωρούνται οι γ-ρετροϊκοί (gammaretroviral vectors) και οι λεντι-ϊκοί φορείς (lentiviral vectors), που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των κυττάρων-στόχων, οδηγώντας σε μακροπρόθεσμη και σταθερή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου, ακόμα και μετά από πολλαπλούς κύκλους κυτταρικής διαίρεσης.⁸

Παρά τις μακροχρόνιες έρευνες και βελτιώσεις στο σχεδιασμό τους, οι **γ-ρετροϊκοί φορείς** σφαιρίνης απέτυχαν να αποδώσουν αποτελεσματική έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου κυρίως λόγω των χαμηλών τίτλων και της γενετικής αστάθειας. Οι **λεντι-ϊκοί φορείς** που βασίζονται στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1) θεωρήθηκαν ως οι πλέον κατάλληλοι για τη γονιδιακή θεραπεία των αιμοσφαιροπαθειών και αναζωπύρωσαν τις προσδοκίες διόρθωσης των νοσημάτων αυτών με γονιδιακή θεραπεία. Οι λεντι-ϊκοί φορείς κατασκευάζονται μετά από αφαίρεση των γονιδίων που προκαλούν παθογένεια στον άνθρωπο και κατακερματισμό των βοηθητικών γονιδίων σε ξεχωριστά πλασμίδια που συμβάλλουν στη μείωση της πιθανότητας παραγωγής ανασυνδυασμένων μολυσματικών ιικών σωματιδίων. Τα πλεονεκτήματα των λεντι-ϊκών, έναντι των ρετροϊκών φορέων συνίστανται: 1) στην ικανότητα να διαμολύνουν διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα,⁹ 2) στη δυνατότητα να εσωκλείουν διαγονίδια μεγαλύτερου μεγέθους (~9-10 kb)¹⁰ παραμένοντας γενετικά σταθεροί, 3) στο ασφαλέστερο προφίλ θέσεων ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα που διαθέτουν¹¹ και 4) στο σχεδιασμό αυτοαδραναιοποίησης (self-inactivating,

SIN) βάσει του οποίου κατασκευάζονται. Ο μηχανισμός αυτοαδρανοποίησης βασίζεται στην απαλοιφή της περιοχής U3 από την 3' LTR (Long Terminal Repeat) η οποία κατά την ανάστροφη μεταγραφή του ιικού RNA μεταφέρεται στην 5' LTR. Κατά συνέπεια, καταργείται ο ιικός ενισχυτής, οπότε το θεραπευτικό γονίδιο χρειάζεται να μεταγραφεί από έναν εσωτερικό, ερυθροειδικό υποκινητή. Οι δύο τελευταίες ιδιότητες καθιστούν τους λεντι-ϊικούς φορείς ασφαλέστερους των γ-ρετροϊκών φορέων που χαρακτηρίστηκαν σε κλινικές μελέτες ανοσοανεπαρκειών (X-SCID και WAS) ως «υψηλού κινδύνου» για επαγωγή λευχαιμογένεσης.

Θεραπευτική και ερυθροειδική έκφραση

Προυπόθεση για να εκφραστεί σε υψηλά επίπεδα το μεταφερόμενο θεραπευτικό γονίδιο σφαιρίνης είναι η ενσωμάτωση στην κατασκευή του ιικού φορέα τμημάτων της ρυθμιστικής αλληλουχίας του γενετικού τόπου της β-σφαιρίνης, **Locus control region (LCR)**, η οποία διαθέτει τουλάχιστον 7 θέσεις υπερευαίσθητες στην DNάση I (Hypersensitive sites, HS) 48-62 kb ανοδικά του β-γονιδίου,¹² και αυξάνει την ιστοειδικότητα της έκφρασης¹³ ανάλογα με το εκάστοτε στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου,¹⁴ ενώ επιπρόσθετα προστατεύει τα γονίδια από την αποσιώπηση.¹⁵ Οι περισσότεροι θεραπευτικοί λεντι-ϊικοί φορείς που έχουν κατασκευαστεί μέχρι σήμερα, εκφράζουν το διαγονίδιο της β-, ή της γ-σφαιρίνης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της, ενός εκ των δύο εγγύτατων ενισχυτών της¹⁶ και περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο HS στοιχεία της LCR.¹⁷⁻²⁰ Η υψηλή εξειδίκευση της έκφρασης, αποκλειστικά στην ερυθρά σειρά, εξασφαλίζεται από τη μεταγραφή του β-γονιδίου από εσωτερικό, ερυθροειδικό υποκινητή.

Σταθερή και ομοιογενής έκφραση

Η έκφραση του ιικού φορέα μπορεί να ποικίλλει σημαντικά καθώς επηρεάζεται από την περιβάλλουσα χρωματίνη στις μη προβλέψιμες, θέσεις ενσωμάτωσής του στο γονιδίωμα. Η ποικιλία και ανομοιογένεια στην έκφραση των φορέων που προκύπτει από την ενσωμάτωση σε διαφορετικές χρωμοσωμικές θέσεις και άρα διαφορετικές επιδράσεις της περιβάλλουσας χρωματίνης έχει περιγραφεί ως «φαινόμενα θέσεων». Οι **μονωτές χρωματίνης τύπου φραγμού** είναι εξειδικευμένες DNA ακολουθίες που οριοθετούν ορισμένα γονίδια και παρέχουν φυσικό φραγμό σε επιδράσεις από γειτονικές χρωμοσωμικές επικράτειες. Όταν τα γονίδια μετακινούνται από το φυσικό τους περιβάλλον, όπως σε εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας, το νέο χρωμοσωμικό περιβάλλον έχει καθοριστική επίδραση στην έκφρασή του και συχνά τα επίπεδα έκφρασης στη νέα θέση δεν έχουν καμμία ομοιότητα

με αυτά της φυσικής τους θέσης. Αυτή η ανομοιογένεια στην έκφραση προκύπτει συνήθως λόγω γεινίασης με έναν ενδογενή ενισχυτή ή αποσιωπητή ή αντανακλά την τοποθέτηση του γονιδίου αναφοράς κοντά σε περιοχή ανενεργού χρωματίνης.^{21,22} Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος χρωματινικός μονωτής είναι η υπερευαίσθητη στην DNase I περιοχή 4 από τον β γονιδιακό τόπο της όρνιθας (cHS4, chicken hypersensitive site 4) και η ενσωμάτωσή του υπό μορφή διπλού αντιγράφου (double copy configuration) στα άκρα ιικών φορέων, φάνηκε να προστατεύει -αν και όχι πλήρως- την *in vivo* έκφραση του διαγονιδίου από τις αρνητικές επιδράσεις του χρωματινικού περιβάλλοντος, οδηγώντας σε σταθερή και ομοιογενή έκφραση.²³

Ασφάλεια

Παρά την αδιαφισβήτητη επιτυχία της ΓΘ στις ανοσοανεπάρκειες²⁴⁻²⁶ και τα μεταβολικά νοσήματα αποθήκευσης,^{27,28} η **εισχωρητική μεταλλαξιγένεση** που προκαλείται από τους ενσωματούμενους ιικούς φορείς, αντιπροσωπεύει τη μείζονα τοξικότητα της διαδικασίας. Η λευχαιμική εκτροπή σε παιδιά με X-SCID (5/20)²⁹ ή σύνδρομο Wiscott-Aldrich (6/10)³⁰ που είχαν επιτυχώς υποβληθεί σε γονιδιακή θεραπεία με ρετροϊκούς φορείς για τη νόσο τους, σταδιακά επισκίασε τις πρώτες επιτυχίες της γονιδιακής θεραπείας και ενέτεινε την έρευνα προς την κατεύθυνση ελάττωσης του κινδύνου γενετοξικότητας της μεθόδου. Η λευχαιμική εκτροπή σχετίστηκε με ενσωμάτωση του ιικού φορέα στη γειτονία πρωτο-ογκογονιδίων και ενεργοποίηση παράδοξης έκφρασης αυτών των ογκογονιδίων μέσω του ενισχυτή της ιικής LTR.

Σε νοσήματα με μικρό προσδόκιμο επιβίωσης όπως η σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια ή η μεταχρωματική λευκοδυστροφία, ένα ποσοστό σοβαρής τοξικότητας θα μπορούσε να είναι αποδεκτό όταν το όφελος αντισταθμίζει τον κίνδυνο. Για παράδειγμα, από τα 20 παιδιά που υποβλήθηκαν σε ΓΘ για X-SCID, τα 19 είναι στη ζωή και θεραπευμένα, μέχρι και 16 χρόνια μετά τη διαδικασία, ενώ κανένα δεν θα ζούσε σήμερα χωρίς τη γονιδιακή θεραπεία. Ωστόσο, για χρόνια νοσήματα με γενικά καλοήγη πορεία, όπως η θαλασσαιμία για τους ασθενείς με καλή συμμόρφωση στη θεραπεία, είναι σαφές ότι το προσδοκώμενο όφελος θα πρέπει να είναι υψηλό και να δικαιολογεί ισχυρά τον κίνδυνο από τη διαδικασία. Ανεξάρτητα πάντως από τη βαρύτητα της νόσου-στόχου, η ασφάλεια της διαδικασίας και η ελαχιστοποίηση της συχνότητας εμφάνισης εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης αποτελούν τα τελευταία χρόνια μείζον πεδίο έρευνας και σημαντικές βελτιώσεις ασφάλειας στο σχεδιασμό ιικών φορέων έχουν επιτευχθεί.

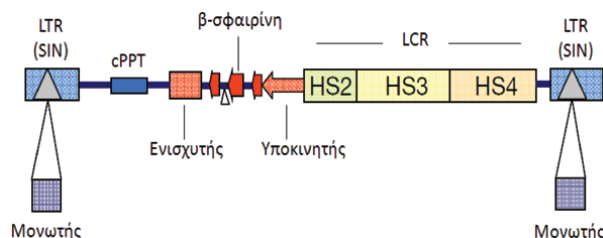
Οι λεντι-ϊικοί φορείς που κωδικοποιούν την ανθρώπινη β-σφαιρίνη και οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε κλινικές

μελέτες, έχουν κατασκευαστεί με χαρακτηριστικά ασφάλειας που μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο της ογκογένεσης που σχετίζεται με τον ιικό φορέα συγκριτικά με τους πρώτης γενιάς γ-ρετροϊικούς φορείς: **ο σχεδιασμός αυτοδρανοποίησης (SIN)** που περιγράφηκε πιο πάνω καταργεί την ική LTR, τον καθοριστικό παράγοντα γενοτοξικότητας.^{31,32} Παρά τον SIN σχεδιασμό, οι φορείς σφαιρίνης φέρουν έναν πολύ ισχυρό ενισχυτή μέσω των στοιχείων της ρυθμιστικής ακολουθίας του β-γονιδίου (Locus Control Region-LTR) από την ενεργοποίηση του οποίου πρέπει να προστατευθεί το γειτονικό περιβάλλον στη θέση ενσωμάτωσης.^{33,34} Οι **μονωτές χρωματίνης τύπου διακόπτη ενισχυτών** οι οποίοι όταν βρίσκονται μεταξύ υποκινητή-ενισχυτή μπλοκάρουν την μέσω του ενισχυτή ενεργοποίηση του υποκινητή παρακείμενων γονιδίων, έχουν χρησιμοποιηθεί σε κατασκευές ικών φορέων για να ελαττώσουν τη συχνότητα εμφάνισης εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης. Ο cHS4, μονωτής χρωματίνης «διπλής δράσης» αποτελεί και σε αυτή την κατηγορία μονωτών, τον καλύτερα χαρακτηρισμένο μονωτή τύπου διακόπτη ενισχυτών. Μείζον μειονέκτημα της ενσωμάτωσής του σε ικούς φορείς αποτελεί ο σημαντικός επηρεασμός των τίτλων του ικού φορέα και κατ' επέκταση της αποτελεσματικότητας της γονιδιακής μεταφοράς, εξαιτίας του σχετικά μεγάλου μεγέθους του.

Σύμφωνα με τα προλεχθέντα, ο ιδεώδης λεντι-ικός φορέας β-σφαιρίνης με τον θεωρητικά βέλτιστο συνδυασμό ρυθμιστικών στοιχείων, υποκινητή και ενισχυτή καθώς και με την κατάλληλη μόνωση εκατέρωθεν των SIN άκρων του, παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.³⁵

Προκλινικές Μελέτες

Η ομάδα του Michel Sadelain, χρησιμοποιώντας τον λεντι-ικό φορέα TNS9, κατέδειξε για πρώτη φορά διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου τόσο σε Hbb^{th3/+} ποντίκια³⁶ που προσομοιάζουν στην ενδιάμεση β-θαλασσαιμία του ανθρώπου, όσο και σε τεχνητό μοντέλο μείζονος β-θαλασσαιμίας.³⁷ Η θεραπευτική έκφρα-



Εικόνα 1. Προτυποποιημένος λεντι-ικός φορέας β-σφαιρίνης με τα ρυθμιστικά του στοιχεία Συντομογραφίες: HS: hypersensitive sites; LCR: locus control region; SIN: self-inactivating; LTR: long terminal repeats.

ση του διαγονιδίου στην περίπτωση του μοντέλου της ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας, αύξησε την αιμοσφαιρίνη στο 11-13 g/dl, διόρθωσε την εξωμυελική ερυθροποίηση, ελάττωσε την άθροιση του σιδήρου και παρέμεινε σταθερή και μετά από δευτερογενή μεταμόσχευση. Στην περίπτωση του μοντέλου της μείζονος θαλασσαιμίας, το οποίο είναι μη βιώσιμο από την εμβρυική ζωή, οι ακτινοβολημένοι λήπτες των θαλασσαιμικών εμβρυικών κυττάρων ήπατος μετά από γονιδιακή μεταφορά ανέπτυξαν έναν φαινότυπο ενδιάμεσης θαλασσαιμίας και επέζησαν αντίθετα με τους λήπτες των μη γενετικά τροποποιημένων κυττάρων που ανέπτυξαν φαινότυπο μείζονος θαλασσαιμίας και απεβίωσαν. Ακολούθησαν και άλλες ομάδες, μεταξύ αυτών του Leboulch,³⁸ του Persons,³⁹ της Malik⁴⁰ και της Ferrari⁴¹ που έδειξαν επιτυχή γονιδιακή διόρθωση τόσο σε ζωικά μοντέλα θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής νόσου⁴² όσο και σε κύτταρα θαλασσαιμικών ασθενών.^{43,44}

Σχεδιασμός Κλινικών Πρωτοκόλλων: Θέματα προς επίλυση

Προπαρασκευαστικό σχήμα

Το υπόστρωμα της θαλασσαιμίας, αντίθετα με την X-SCID, δεν παρέχει πλεονέκτημα επιβίωσης στα γενετικά διορθωμένα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34⁺), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μακροπρόθεσμη αιματολογική αποκατάσταση, ενώ αναμένεται πλεονέκτημα επιβίωσης των γενετικά διορθωμένων ερυθροβλαστών και ερυθροκυττάρων. Κατά συνέπεια, η εμφύτευση των CD34⁺ κυττάρων μετά τη γονιδιακή μεταφορά, απαιτεί είτε την *in vivo* επιλογή τους⁴⁵ είτε εφαρμογή μυελοκαταστολής στον ασθενή.

Η χορήγηση ολικής μυελοκαταστολής, θα εξασφαλίσει την καθ' ύπεροχόν εγκατάσταση χίμαιρας προερχόμενης από τα γενετικά διορθωμένα κύτταρα, με κόστος ωστόσο σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση, τοξικότητα ιδιαίτερος ανεπιθύμητη σε μη κακοήθεις ασθένειες, όπως η β-θαλασσαιμία. Ένα ελαττωμένης έντασης προπαρασκευαστικό σχήμα μειώνει τους κινδύνους που συνοδεύουν την απλασία ή την περίπτωση μη εμφύτευσης του μοσχεύματος διακινδυνεύοντας ωστόσο, ανεπαρκή, για θεραπευτικό όφελος, ποσοστά εμφύτευσης.

Αν και υπάρχει ομοφωνία στο ότι ένας σημαντικός βαθμός μυελοκαταστολής πρέπει να εφαρμοστεί ως προπαρασκευαστικό σχήμα πριν τη χορήγηση των γενετικά διορθωμένων CD34⁺ στους ασθενείς με θαλασσαιμία, το βάθος μυελοκαταστολής που μπορεί να εξασφαλίσει επαρκή εμφύτευση με αποδεκτή, αιμοποιητική και μη αιμοποιητική, τοξικότητα, παραμένει αντικείμενο επιστημονικών αντιπαραθέσεων.

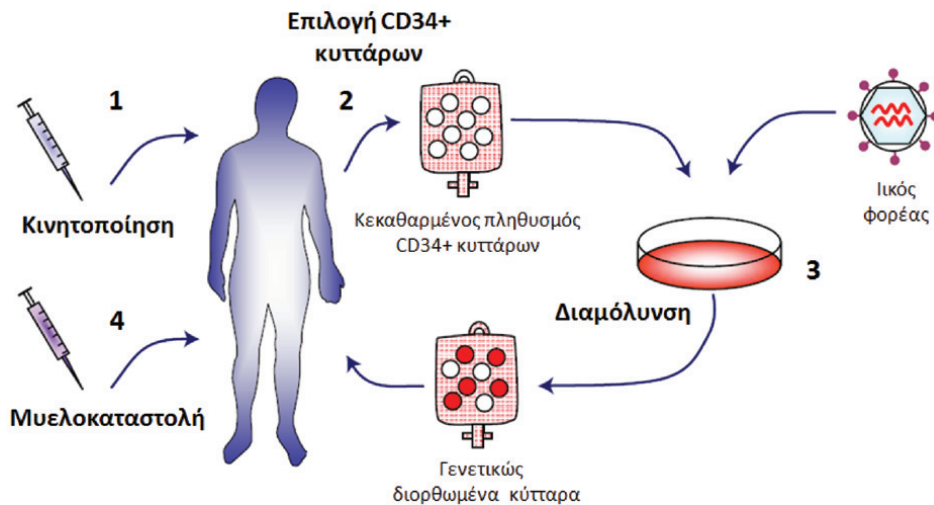
Μελέτες στην αλλογενή μεταμόσχευση για τη θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο έδειξαν ότι ακόμη και χαμηλά επίπεδα χίμαιρας του δότη μπορούν να προσφέρουν ανεξαρτησία από μεταγγίσεις, υποστηρίζοντας την άποψη ότι και χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης των γενετικά διορθωμένων κυττάρων μπορούν να αποδώσουν θεραπευτικό όφελος.⁴⁶ Ωστόσο, το όριο της χίμαιρας των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων που απαιτείται για κλινική βελτίωση στη ΓΘ της θαλασσαιμίας δεν έχει οριστικά καθοριστεί. Μελέτες σε ζωικό μοντέλο β-θαλασσαιμίας προτείνουν ότι ένα επίπεδο χίμαιρας 20-30% και έκφραση διαγονιδίου μεγαλύτερη από το 15% της συνολικής α-σφαιρίνης είναι απαραίτητα για ανεξάρτηση από μεταγγίσεις, ποσοστά γενικά πολύ υψηλότερα αυτών που απαιτούνται για θεραπευτικό όφελος με τη ΓΘ άλλων γενετικών νοσημάτων.⁴⁷

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, εκτιμάται ότι ένα ελαττωμένης έντασης προπαρασκευαστικό σχήμα, με Busulfan 8-12 mg/kg ή Melphalan 140 mg/m² θα μπορούσε να προκαλέσει επαρκή μυελοκαταστολή για να επιτρέψει στα διαμολυσμένα HSCs να φθάσουν σε κλινικά μεταφράσιμα επίπεδα εμφύτευσης ενώ θα διατηρούσε επαρκές επίπεδο ασφάλειας, συμβατό με κλινικές μελέτες φάσης I.³⁵ Ωστόσο, είναι σημαντικό να υπάρξει πρόβλεψη για να αντισταθμιστεί η υπό αυτές τις συνθήκες, χαμηλή εμφύτευση, με χρήση μεθόδων που θα εξασφαλίζουν υψηλά επίπεδα γονιδιακής μεταφοράς και υψηλές δόσεις γενετικά τροποποιημένων κυττάρων. Οι μέθοδοι αυτές συζητώνται παρακάτω.

Τα στάδια της γονιδιακής θεραπείας για τη θαλασσαιμία (αλλά και γενικότερα για εφαρμογές ΓΘ σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα) παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 2.

Συλλογή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων-Βέλτιστη πηγή μοσχεύματος

Σε πρωτόκολλα ΓΘ, όπως για τη θαλασσαιμία, προκειμένου να εξασφαλιστεί σταθερή εμφύτευση των γενετικά τροποποιημένων HSCs και χαμηλή τοξικότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση, ο βέλτιστος αριθμός των χορηγούμενων CD34⁺ κυττάρων πρέπει να είναι πολύ υψηλότερος από το χαμηλότερο αποδεκτό όριο των 2×10^6 /kg CD34⁺ κυττάρων για αυτόλογη μεταμόσχευση.^{35,48} Ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου εφαρμόζεται προπαρασκευαστικό σχήμα ελαττωμένης έντασης, δημιουργώντας έτσι ανταγωνιστικές συνθήκες στον μυελό των οστών, είναι απαραίτητη η χορήγηση υψηλών δόσεων γενετικά διορθωμένων κυττάρων για να μπορέσουν να επικρατήσουν έναντι των μη διορθωμένων, ενδογενών κυττάρων του μυελού. Επιπρόσθετα, για λόγους ασφάλειας ένα backup μη επεξεργασμένων CD34⁺ κυττάρων αποθηκεύεται προς διάσωση σε περίπτωση αποτυχίας εμφύτευσης, γεγονός που αυξάνει ακόμη περισσότερο την ανάγκη για υψηλή απόδοση σε HSCs των ασθενών με θαλασσαιμία. Κατά συνέπεια, η βέλτιστη πηγή HSCs για τη γονιδιακή θεραπεία της θαλασσαιμίας είναι εκεί-



Εικόνα 2. Σχηματικά η γονιδιακή θεραπεία για τη β-θαλασσαιμία.³⁵ Γίνεται *ex vivo* γονιδιακή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου της β-σφαιρίνης μέσω λεντιϊκού φορέα σε κινητοποιημένα και κεκαθαρισμένα CD34⁺ κύτταρα του ασθενούς (1, 2). Η γονιδιακή μεταφορά επιτυγχάνεται με συγκαλλιέργεια του ιικού φορέα με τα CD34⁺ κύτταρα στη διάρκεια της οποίας γίνεται η είσοδος και η ενσωμάτωσή του στα κύτταρα-στόχος (3). Τα αυτόλογα, γενετικώς διορθωμένα κύτταρα επανεγχύονται πίσω στον ασθενή μετά από προπαρασκευαστικό σχήμα πλήρους ή μερικής μυελοκαταστολής (4).

νη που παρέχει με ασφάλεια υψηλές δόσεις κυττάρων με αυξημένη ικανότητα εμφύτευσης.

Το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα αποτελεί την προτιμώμενη πηγή μοσχεύματος σε σχέση με τον μυελό των οστών καθώς αποδίδει 3-4 φορές περισσότερα CD34⁺ κύτταρα με ταχύτερη ικανότητα εμφύτευσης.^{48,49} Η κυτταροκίνη G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) αποτελούσε μέχρι πρότινος τον μόνο κατάλληλο για κλινική χρήση παράγοντα κινητοποίησης HSCs με ευρεία εφαρμογή σε περιπτώσεις αυτόλογης ή αλλογενούς μεταμόσχευσης,⁵⁰ καθώς και σε κλινικές δοκιμές ΓΘ.^{27,44,51} Η χρήση του G-CSF ωστόσο, έχει σχετιστεί με συγκεκριμένη νοσηρότητα^{52,53} και υπάρχουν ασθενείς που αποτυγχάνουν να κινητοποιήσουν επιτυχώς, καθώς και φυσιολογικοί δότες που υποβάλλονται σε πολλαπλές συνεδρίες λευκαφαίρεσης.⁵⁴ Περιορισμοί στη χρήση του G-CSF έχουν αναφερθεί και σε νοσήματα που αποτελούν δυνητικό στόχο της ΓΘ. Παραδείγματος χάριν, σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, η χρήση του G-CSF πυροδοτεί οξεία δρεπανοκυτταρική κρίση, η οποία μπορεί να αποβεί μοιραία,⁵⁵ ενώ άτομα με αναιμία Fanconi κινητοποιούν φτωχά ακόμα και μετά από πολύ υψηλές δόσεις G-CSF.⁵⁶ Τα τελευταία χρόνια, το Plerixafor (πρώην AMD3100), χάρη στην ικανότητά του να αναστέλλει παροδικά τη σύνδεση του CXCR4 με τον SDF-1 στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, κινητοποιεί ταχύτερα τα CD34⁺ κύτταρα ενώ αυξάνει πολλαπλάσια την απόδοση της κινητοποίησης όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον G-CSF.^{57,58}

Με την προοπτική της ΓΘ για τη νόσο και για τη βελτιστοποίηση της κινητοποίησης των CD34⁺ κυττάρων σε ενήλικες ασθενείς με θαλασσαιμία, διερευνήσαμε δύο κλινικές μελέτες κινητοποίησης των CD34⁺ κυττάρων.^{59,60} Στις μελέτες αυτές διερευνήθηκε η χρήση του G-CSF ως μονήρη παράγοντα και μετά από προθεραπεία με Hydroxyurea (HU) και του Plerixafor ως μονήρη παράγοντα ή σε συνδυασμό με G-CSF, στους ασθενείς που απέτυχαν να κινητοποιήσουν επαρκώς με τους μονήρεις παράγοντες.

Η πρώτη μελέτη (THAL001), που συμπεριέλαβε 26 ασθενείς, κατέδειξε ότι η κινητοποίηση με G-CSF στους μη σπληνεκτομηθέντες ασθενείς είναι ασφαλής και ανάλογης αποτελεσματικότητας με τους φυσιολογικούς δότες, ωστόσο, στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς προκαλεί υπερλευκοκυττάρωση η οποία αποτελεί σημαντικό δοσο-περιοριστικό παράγοντα στην κινητοποίησή τους, με τελικό αποτέλεσμα φτωχή ή μέτρια απόδοση σε CD34⁺ κύτταρα. Η ενός μήνα προθεραπεία με HU με ένα βέλτιστο διάστημα, 2 εβδομάδων, «έκπλυσης» πριν τον G-CSF, ξεπερνά τον περιορισμό της υπερλευκοκυττάρωσης στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς υπό G-CSF, αλλά παρατείνει σημαντικά τη διαδικασία κινητοποίησης.⁵⁹

Λόγω των περιορισμών της κινητοποίησης με G-CSF στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς με θαλασσαιμία αλ-

λά και σε άλλους ασθενείς για τους οποίους η ΓΘ θα μπορούσε να είναι θεραπεία ίασης (δρεπανοκυτταρική νόσος, Fanconi anemia)^{55,56} διερευνήσαμε την κινητοποίηση με Plerixafor (Mozobil) μόνο ή Plerixafor+G-CSF στις περιπτώσεις αποτυχίας συλλογής επαρκών δόσεων CD34⁺ κυττάρων ($\geq 6 \times 10^6/\text{kg}$).⁶⁰ Η μελέτη THAL002, που συμπεριέλαβε 20 ασθενείς, κατέδειξε ότι το Plerixafor κινητοποιεί ταχέως και αποτελεσματικά τα CD34⁺ κύτταρα, χωρίς επαγωγή υπερλευκοκυττάρωσης στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς. Ωστόσο, περίπου το 30% των ασθενών απέτυχε να αποδώσει με 2 λευκαφαιρέσεις τη δόση-στόχο ($\geq 6 \times 10^6/\text{kg}$) και ασθενείς που απέτυχαν αρχικά στο Plerixafor ή G-CSF επανακινητοποιήθηκαν με Plerixafor+G-CSF. Ο συνδυασμός ήταν καλά ανεκτός, αύξησε την ανά αφαίρεση απόδοση 3 έως 14 φορές και, σε όλες τις περιπτώσεις, διενεργήθηκε μονήρης κυτταραφαίρεση για τη συλλογή του επιθυμητού αριθμού κυττάρων. Η ισχυρή συνεργική δράση του συνδυασμού ήταν ιδιαίτερα εμφανής στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς στους οποίους, παρά την κατά 75% ελάττωση της δόσης G-CSF, απέδωσε υψηλό αριθμό κυττάρων ($6-12.7 \times 10^6/\text{kg}$) με μονήρεις αφαιρέσεις.

Συμπερασματικά, για εφαρμογές ΓΘ στη θαλασσαιμία, όπου χρειάζονται πολύ υψηλοί αριθμοί CD34⁺ κυττάρων ($6-12 \times 10^6/\text{kg}$) ή όταν αποτυχία κινητοποίησης με μονήρεις παράγοντες είναι ισχυρά πιθανή ή όταν απαιτούνται μονήρεις αφαιρέσεις, ο συνδυασμός με Plerixafor+G-CSF αποτελεί τη βέλτιστη στρατηγική κινητοποίησης.

Καθώς η κινητοποίηση με διαφορετικές μεθόδους μπορεί να δώσει γένεση σε CD34⁺ κύτταρα με διαφορετική επιδεκτικότητα στη διαμόλυνση ή ικανότητα εμφύτευσης μετά από μεταμόσχευση, διερευνήσαμε εάν το Plerixafor+G-CSF-αιμοποιητικό μόσχευμα υπερέχει όχι μόνο ποσοτικά σε CD34⁺ κύτταρα αλλά και ποιοτικά. Πράγματι, η μεταμόσχευση ίδιου αριθμού Plerixafor+G-CSF-κινητοποιημένων HSCs σε ζωικά μοντέλα ανταγωνιστικής μεταμόσχευσης (Psatha N, et al, submitted) αλλά και σε μοντέλο ξενομεταμόσχευσης με μερική μυελοκαταστολή μετά από γενετική τροποποίηση των CD34⁺ κυττάρων ασθενών με τον TNS9.3.55 λεντι-ικό φορέα β-σφαιρίνης (Karponi G, et al, submitted), οδήγησε σε σημαντική υπεροχή πολυγραμμικής εμφύτευσης έναντι όλων των υπόλοιπων μεθόδων κινητοποίησης, ενώ τα Plerixafor+G-CSF-κινητοποιημένα κύτταρα απέδωσαν σημαντικά περισσότερη β-σφαιρίνη/ικό αντίγραφο σε ερυθροειδικές υγρές και ημι-στερεές καλλιέργειες.

Συνοψίζοντας, τα Plerixafor+G-CSF κύτταρα αποτελούν τη βέλτιστη πηγή κινητοποιημένου αιμοποιητικού μοσχεύματος καθώς i) έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε CD34⁺ κύτταρα που επιτρέπει μονήρεις κυτταραφαιρέσεις, ii) είναι επιδεκτικά στη διαμόλυνση αποδίδοντας τη μεγαλύτερη έκφραση β-σφαιρίνης ανά αντίγραφο ιικού φορέα και iii) διαθέτουν υψηλή ικανότητα εμφύτευσης υπό ανταγωνιστικές συνθήκες. Η χρήση ενός τέτοιου

μοσχεύματος για ΓΘ της θαλασσαιμίας θα επιτρέψει την εφαρμογή ενός ελαττωμένης έντασης προπαρασκευαστικού σχήματος επιτυγχάνοντας δυναμικά κλινικά μεταφράσιμα επίπεδα γονιδιακής μεταφοράς και έκφρασης με χαμηλή τοξικότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση. Επίσης θα ελαττώσει θεωρητικά την πιθανότητα εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης, καθώς ένα δεδομένο επίπεδο έκφρασης β-σφαιρίνης θα μπορεί να επιτευχθεί με μικρότερο αριθμό ικών αντιγράφων.

Κλινικές Μελέτες

Η πρώτη κλινική μελέτη ΓΘ για τη β-θαλασσαιμία διενεργήθηκε στο Παρίσι, με χρήση ενός SIN λεντικού φορέα β-σφαιρίνης που κατασκευάστηκε από την ομάδα του P. Leboulch και είχε ενσωματωμένο τον μονωτή χρωματίνης cHS4 σε σχηματισμό διπλού αντιγράφου. Τρεις θαλασσαιμικοί ασθενείς με β⁰/β^E θαλασσαιμία, μετά από ένα πλήρως μυελοκατασταλτικό conditioning (Busulfan 14 mg/kg), μεταμοσχεύτηκαν με αυτόλογα HSCs που διαμολύνθηκαν με τον μονωμένο με τον cHS4 μονωτή χρωματίνης, φορέα SIN-LentiGlobin.^{61,62} Ο πρώτος ασθενής εμφάνισε αποτυχία εμφύτευσης και παρατεταμένη απλασία και έλαβε διάσωση με τα μη γενετικά τροποποιημένα CD34⁺ κύτταρά του, τα οποία είχαν ψυχθεί προληπτικά ως backup. Ο τρίτος ασθενής, 2 χρόνια μετά τη γονιδιακή θεραπεία, εμφανίζει χαμηλά ποσοστά γονιδιακής μεταφοράς *in vivo* και παραμένει εξαρτημένος από μεταγίσεις. Ο δεύτερος ασθενής, μεταγιστόταν κατά τον πρώτο χρόνο μετά την έγχυση των γενετικά διορθωμένων κυττάρων και στη συνέχεια η αιμοσφαιρίνη του σταθεροποιήθηκε σε επίπεδα που του επιτρέπουν να ζει χωρίς μεταγίσεις (9-10 g/dl) 6 και πλέον χρόνια μετά. Το επίπεδο των γενετικά διορθωμένων κυττάρων αυξήθηκε προοδευτικά μετά τη μεταμόσχευση για να σταθεροποιηθεί στο 10%, 30 μήνες μετά. Ωστόσο, παρατηρήθηκε επικράτηση κλώνου και έκπτωση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων που περιείχαν τον φορέα ενσωματωμένο στο γονίδιο HMGA2, το οποίο φέρεται ως πιθανό ογκογονίδιο.⁶³ Ευτυχώς αυτή η κλωνική επικράτηση δεν εξελίχθηκε σε λευχαιμική εκτροπή και φάνηκε να σταθεροποιείται και μετά την πενταετία να υποχωρεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι, από τη συνολική αιμοσφαιρίνη του ασθενούς μετά τη ΓΘ, μόνο το 1/3 προέρχεται από τα γενετικά διορθωμένα κύτταρα, το άλλο 1/3 από μία μη αναμενόμενη αύξηση της HbF μετά την έγχυση των γενετικά διορθωμένων κυττάρων και το τελευταίο 1/3 από την ενδογενή παραγωγή της HbE.

Η δεύτερη τρέχουσα κλινική μελέτη και η πρώτη στις ΗΠΑ, πραγματοποιείται στο Memorial Sloan-Kettering Cancer Center της Νέας Υόρκης, από τον Michel Sadelain και συν. Όπως ανακοινώθηκε στο ASGCT Meeting 2014, Washington DC, τρεις ασθενείς με μείζονα β⁰/β⁺ θαλασ-

σαιμία έλαβαν γενετικά διορθωμένα CD34⁺ κύτταρα από G-CSF κινητοποιημένο περιφερικό αίμα, έπειτα από μερική μυελοκαταστολή με Busulfan 8 mg/kg. Στους δύο που συμπλήρωσαν παρακολούθηση ενός έτους, τα επίπεδα των γενετικά διορθωμένων κυττάρων κυμαίνονται μεταξύ 6-10% και οι ασθενείς παραμένουν μεταγισιοεξαρτώμενοι αν και τα διαστήματα μεταξύ των μεταγισσεων φαίνεται να αυξάνονται σταδιακά.

Υπάρχει μία τρίτη, σε εξέλιξη, πολυεθνική (Γαλλία, ΗΠΑ, Ταϊλάνδη, Αυστραλία) κλινική μελέτη, που διενεργεί η Blue Bird BIO που παράγει τον ικό φορέα σε κλινική κλίμακα και χρησιμοποιεί τροποποιημένο τον λεντι-ικό φορέα της Γαλλικής μελέτης (με αφαίρεση του cHS4 και με αντικατάσταση του HIV-υποκινητή με έναν CMV υποκινητή) και στην οποία μέχρι σήμερα 4 ασθενείς με β⁰/β^E θαλασσαιμία έχουν λάβει γενετικά τροποποιημένα κύτταρα μετά από πλήρως μυελοκατασταλτικό conditioning με Busulfan 14 mg/kg. Αποτελέσματα έχουν ανακοινωθεί για δύο ασθενείς στη Γαλλία (EHA 2014, Milan) οι οποίοι 2 και 4.5 μήνες μετά τη ΓΘ είναι χωρίς μεταγίσεις (καμμία μετάγισση μετά την εμφύτευση) και με Hb 10.1 και 11.6 g/dl από την οποία τα 4.4 και 6.6 g/dl αντίστοιχα, προέρχονται από τα γενετικά διορθωμένα κύτταρα (η υπόλοιπη Hb συμπληρώνεται από την ενδογενή παραγωγή HbE και σε μικρό ποσοστό HbF).

Η γνώση που αποκτήθηκε από τις κλινικές μελέτες μέχρι σήμερα

Ασφάλεια φορέων σφαιρίνης

Οι λεντι-ικοί SIN φορείς σφαιρίνης λόγω του σχεδιασμού αυτοαδρανοποίησης, του προτύπου ενσωμάτωσης των λεντι-ιών, της ερυθροειδικότητας της έκφρασης και ενίοτε της παρουσίας μονωτών χρωματίνης, θεωρούνται μικρού κινδύνου για πρόκληση εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης μετά τη γενετική τροποποίηση των κυττάρων-στόχων. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι αυτά τα χαρακτηριστικά ασφάλειας μειώνουν τον κίνδυνο γενοτοξικότητας, παραμένουν υποβέλτιστα. Στην κλινική μελέτη στο Παρίσι, ευτυχώς, ο επικρατών κλώνος με την ενεργοποίηση του HMGA2 γονιδίου δεν εξελίχθηκε σε λευχαιμία. Ωστόσο, η κλωνική επικράτηση σε αυτή την περίπτωση ήγειρε ερωτήματα ως προς: α) την -προφανώς όχι σπάνια- πιθανότητα ενσωμάτωσης των λεντι-ικών φορέων σφαιρίνης εγγύς γονιδίων που ρυθμίζουν πολλαπλασιασμό, προωθώντας κατά συνέπεια, ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα και υπερέκπτωση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, β) την αδυναμία του cHS4 μονωτή χρωματίνης να εξασκήσει την δράση του ως διακόπτη ενισχυτών (πιθανόν ως αποτέλεσμα υποβέλτιστα του σχεδιασμού του φορέα): αν και δύο αντίγραφα του

μονωτή χρωματίνης συμπεριλήφθηκαν στον φορέα, με στόχο την ελαχιστοποίηση της επίδρασης των μεταγραφικών σημάτων του φορέα σε γειτνιάζοντα γονίδια, στην πλειονότητα των ενσωματώσεων του φορέα ανιχνεύθηκαν μόνο μονήρη αντίγραφα, υποδηλώνοντας αστάθεια και ανασυνδυαστική απώλεια και γ) την ανάγκη αναθεώρησης της επικρατούσας άποψης ότι η LCR μέσω της παρεχόμενης ερυθροειδικής έκφρασης ελαττώνει τον κίνδυνο της λευχαιμικής εκτροπής και κλωνικής έκπτυξης σε άλλα κύτταρα εκτός των, σε τελικό στάδιο διαφοροποίησης, ερυθροκυττάρων. Πράγματι, στην κλινική μελέτη στο Παρίσι, η υπερέκφραση του επικρατούντος μετάγραφου στην ερυθρά σειρά συνέβη, τουλάχιστον μερικώς, από ενεργοποίηση του HMGA2 υποκινητή δι-αμεσολαβούμενη από την LCR, ενώ υπάρχει και πειραματική απόδειξη ότι στοιχεία της LCR που περιέχονται στους φορείς μπορούν να διαταράξουν την έκφραση γονιδίων έως 600kb μακριά από τις θέσεις ενσωμάτωσης.³³

Αποτελεσματικότητα των φορέων σφαιρίνης

Παρά την εξαιρετικά επιτυχή διαμόλυνση των HSCs στη ΓΘ των ανοσοανεπαρκειών²⁶ και των λυσοσωμικών νόσων,²⁸ η αποτελεσματική μεταφορά του γονιδίου της σφαιρίνης στα HSCs παραμένει πρόκληση, κυρίως λόγω των παραδοσιακά χαμηλών τίτλων των φορέων σφαιρίνης. Οι φορείς σφαιρίνης χρειάζεται να κατέχουν εξαιρετικά υψηλή μεταγραφική αποτελεσματικότητα για να είναι θεραπευτικοί, ένα θέμα που αντιμετωπίστηκε με την ενσωμάτωση στους φορείς σφαιρίνης στοιχείων από την LCR, με τίμημα ωστόσο τη σημαντική πτώση στους τίτλους των φορέων λόγω του σημαντικού μεγέθους των microLCR κασετών. Η θετική έκβαση στον 2ο Γάλλο ασθενή με β^0/β^E θαλασσαιμία που έλαβε πλήρη μυελοκαταστολή πριν από την έγχυση των γενετικά τροποποιημένων CD34⁺ κυττάρων, ουσιαστικά ήταν το αποτέλεσμα της συνεισφοράς του επικρατούντος κλώνου στην ερυθροποίηση και της ασυνήθους ενεργοποίησης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης μετά τη μεταμόσχευση. Θα μπορούσε λοιπόν κάποιος εύλογα να υποθέσει ότι απεξάρτηση από τις μεταγίσεις πιθανόν να μην είχε επιτευχθεί εάν τα δύο αυτά, μη αναμενόμενα γεγονότα (η κλωνική έκπτυξη και η αύξηση της HbF) δεν είχαν συμβεί. Πραγματικά, ενώ παρόμοια ποσοστά *in vivo* γονιδιακής μεταφοράς επιτεύχθηκαν, ακόμη και με μερική μυελοκαταστολή, στη μελέτη της NY, δεν παρατηρήθηκε θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Η τρίτη μελέτη, παρά το γεγονός ότι τα πρώτα αποτελέσματα είναι εντυπωσιακά, δεν μπορεί να αποτιμηθεί πλήρως λόγω του μικρού διαστήματος παρακολούθησης των ασθενών και του ιδιαίτερου υπότυπου (β^0/β^E) της θαλασσαιμίας που στοχεύει. Πρέπει να υπογραμμιστεί, ότι το γεγονός της πρώιμης απεξάρτησης από τις μεταγίσεις για β^0/β^E ασθενείς, είναι εντυπωσιακό και ιδιαίτερα

ελπιδοφόρο, ωστόσο η απεξάρτηση από τις μεταγίσεις για ασθενείς β^0/β^0 ή ακόμη και β^0/β^+ να μην είναι ένας το ίδιο προσβάσιμος στόχος υπό αυτές τις συνθήκες. Η παραγόμενη αιμοσφαιρίνη από τα γενετικά διορθωμένα κύτταρα σε ποσότητες 4.4 και 6.6 g/dl στους δύο θεραπευμένους β^0/β^E ασθενείς δεν επαρκεί για να τους καταστήσει ανεξάρτητους από μεταγίσεις.

Συνοπτικά, παρά την απόδειξη της αρχής ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να θεραπεύσει τη θαλασσαιμία και την αδιαμφισβήτητη πρόοδο που επιτεύχθηκε στο συγκεκριμένο πεδίο, η γνώση που κερδήθηκε από τις μέχρι σήμερα κλινικές μελέτες υπογραμμίζει την ανάγκη βελτιώσεων προς την κατεύθυνση μεγαλύτερης ασφάλειας και αποτελεσματικότητας.

Προοπτικές-βελτιώσεις της γονιδιακής θεραπείας της θαλασσαιμίας

Παραγωγή ασφαλέστερων φορέων σφαιρίνης

Μεγαλύτερη ασφάλεια των φορέων σφαιρίνης είναι απαραίτητη για να περιοριστούν οι ηθικές επιφυλάξεις που προκύπτουν από τον κίνδυνο εισχωρητικής ογκογένεσης σε ασθενείς με ένα χρόνια νόσημα όπως η θαλασσαιμία. Μέχρι σήμερα, ο καλύτερα χαρακτηρισμένος και ευρέως χρησιμοποιούμενος μονωτής χρωματίνης ήταν ο ζωικής προέλευσης cHS4, όπως προαναφέρθηκε. Ωστόσο, η μόνωση που παρείχε δεν ήταν πλήρης και επιπλέον, το σημαντικό του μέγεθος επηρέαζε αρνητικά τους τίτλους των ιικών φορέων. Το Πανεπιστήμιο Washington, μέσω εκτενών μελετών υψηλής απόδοσης του ανθρώπινου γονιδιώματος, έχει ταυτοποιήσει και χαρακτηρίσει λειτουργικά μερικές δεκάδες από ισχυρούς, μικρού μεγέθους, μονωτές τύπου διακόπτη ενισχυτών. Οι μονωτές αυτοί ελέγχονται σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα γενοτοξικότητας για τη μείωση του κινδύνου εισχωρητικής ογκογένεσης καθώς και για την πιθανή πρόσθετη δράση τους ως μονωτές τύπου φραγμού. Έτσι, οι «διπλοί μονωτές» που θα διαθέτουν την ισχυρότερη δράση τύπου διακόπτη ενισχυτών και θα συνδυάζουν επίσης δράση τύπου φραγμού χωρίς να επηρεάζουν αρνητικά τους τίτλους λόγω μεγέθους, θα ενσωματωθούν σε νέους φορείς σφαιρίνης με στόχο την υψηλή ασφάλεια και έκφραση που δεν θα επηρεάζεται αρνητικά από χαμηλούς τίτλους.

Κατασκευή νέας γενιάς φορέων σφαιρίνης

Στο Πανεπιστήμιο Washington γίνεται έρευνα για ταυτοποίηση νέων, ισχυρών ερυθροειδικών ενισχυτών μικρού μεγέθους σε όλες τις υπερευαίσθητες στη DNάση I περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος με τεχνικές υψηλής απόδοσης. Η ανακάλυψη τέτοιων ενισχυτών θα δώσει τη δυνατότητα αντικατάστασης των LCR κασε-

τών στους φορείς σφαιρίνης με μικρού μεγέθους κασέτες ισχυρών ερυθροειδικών ενισχυτών παρόμοιας ή υψηλότερης απόδοσης, από την παραδοσιακά χρησιμοποιούμενη microLCR του β-γονιδίου. Κατά συνέπεια, οι τίτλοι των νέων φορέων που θα δημιουργηθούν αναμένεται να είναι σημαντικά υψηλότεροι των ικών φορέων που χρησιμοποιούνται σήμερα και να οδηγήσουν σε υψηλά ποσοστά γενετικής τροποποίησης σε μελλοντικές κλινικές μελέτες ΓΘ στη θαλασσαιμία.

Εναλλακτικές προσεγγίσεις

Η γενωμική διόρθωση/στόχευση (genome editing) και η παραγωγή και χρήση των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων, τα οποία αναπτύσσονται σε άλλα κεφάλαια του παρόντος τεύχους, αναμένεται να αποτελέσουν στο μέλλον εναλλακτικές θεραπευτικές, και πιθανόν περισσότερο ασφαλείς, προσεγγίσεις για τη θαλασσαιμία,

με δυνατότητα είτε στοχευμένης *in situ* διόρθωσης των υπεύθυνων μεταλλάξεων είτε επιλογής ασφαλών «λιμνών» ενσωμάτωσης (“safe harbors”).

Επίλογος

Μετά από ερευνητικές προσπάθειες δεκαετιών στη ΓΘ της θαλασσαιμίας που χαρακτηρίστηκαν τόσο από απογοητεύσεις όσο και προκλινικές επιτυχίες, η έναρξη κλινικών μελετών για τη γονιδιακή θεραπεία της θαλασσαιμίας σηματοδότησε μία νέα εποχή στο πεδίο. Ανεξάρτητα από τη διαφαινόμενη ανάγκη βελτιώσεων των πρωτοκόλλων και των ικών κατασκευών, που απλά επιβιβάζουν την παραδοχή της θαλασσαιμίας ως μιας μείζονος και συνεχιζόμενης πρόκλησης για τη ΓΘ, η απόδειξη της αρχής έχει επιτευχθεί και σύντομα αναμένονται θεραπευτικά και αναπαραγωγίμα αποτελέσματα στο πλαίσιο κλινικών μελετών.

Gene therapy for thalassemia

by Garyfalia Karponi,¹ Evangelia Yannaki^{1,2}

¹Gene and Cell Therapy Center, Hematology-Bone Marrow Transplantation Unit, George Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece, ²Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA

ABSTRACT: β-thalassemia is the most common monogenetic disease worldwide. The standard of care consists in lifelong transfusions combined with iron chelation and has substantially improved the life expectancy of the patients. However, strict compliance to the treatment severely compromises the patients' quality of life, while it constitutes a significant financial burden for national economies. Failing to comply with the conventional treatment, patients are exposed to life-threatening complications. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT) is the only curative treatment available but it has a narrow application to those patients having a suitable donor as well as young patients without organ damage. Gene therapy (GT), that is the autologous transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells (CD34⁺), represents a promising new therapeutic strategy which is anticipated to reestablish effective hemoglobin production and render patients transfusion and chelation independent without the immunological complications that normally accompany allo-HCT. Prior to the application of GT for thalassemia in the clinic, many years of extensive preclinical research were spent for the optimization of the gene transfer tools and conditions. To date, three GT clinical trials for β-thalassemia and sickle cell disease have been conducted or are in progress and 3 cases of transfusion independence in thalassaemic β⁰/β^E patients have been reported. However, the design of clinical GT protocols for hemoglobinopathies still remains controversial among researchers in the field. In particular, the optimal intensity of the conditioning, the dose range of genetically modified CD34⁺ cells to be infused, the optimal autologous graft source, further improvements of β-globin vectors and foremost, the ambiguous need of surplus safety features in the vector and clinical protocol design are issues that still need to be addressed, thus pointing out thalassemia gene therapy as one of the most challenging approaches in the GT field of genetic disorders. In the present review, the prerequisites to successful implementation of GT for thalassemia, as well as the tough pathway of GT for hemoglobinopathies towards the clinic and the knowledge gained from the first clinical trials along with the remaining questions and challenges, will be discussed. Overall, after decades of research including achievements but pitfalls as well, the path to thalassemia GT in humans is currently open and highly promising.

Βιβλιογραφία

- Weatherall DJ, Clegg JB. Genetic disorders of hemoglobin. *Semin Hematol.* 1999; 36:24-37.
- Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood.* 2010; 115:4331-4336.
- Lucarelli G, Andreani M, Angelucci E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Reviews.* 2002; 16:81-85.
- Lucarelli G, Clift RA, Galimberti M, et al. Marrow transplantation for patients with thalassemia: results in class 3 patients. *Blood.* 1996; 87:2082-2088.
- La Nasa G, Caocci G, Argioli F, et al. Unrelated donor stem cell transplantation in adult patients with thalassemia. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36:971-975.
- Gaziev D, Galimberti M, Lucarelli G, et al. Bone marrow transplantation from alternative donors for thalassemia: HLA-phenotypically identical relative and HLA-nonidentical sibling or parent transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25:815-821.
- Lucarelli G, Gaziev D. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia. *Blood Rev.* 2008; 22:53-63.
- Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, et al. American society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther.* 2003; 8:180-187.
- Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, et al. Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999; 283:682-686.
- Kumar M, Keller B, Makalou N, et al. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gen Ther.* 2001; 12:1893-1905.
- Montini E, Cesana D, Schmidt N, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature Biotechnology.* 2006; 24:687-696.
- Engel JD, Tanimoto K. Looping, linking and chromatin activity: new insights into β -globin locus regulation. *Cell.* 2000; 100:499-502.
- Blom van Assendelft G, Hanscombe O, Grosveld F, et al. The beta-globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. *Cell.* 1989; 56:969-977.
- Forrester WC, Novak U, Gelinis R, et al. Molecular analysis of the human β -globin locus activation region. *PNAS.* 1989; 86:5439-5443.
- Fraser P, Hurst J, Collis P, et al. DNase I hypersensitive sites 1, 2 and 3 of the human beta-globin dominant control region direct position-independent expression. *Nucl Acids Res.* 1990; 18:3503-3508.
- Antoniou M, deBoer E, Habets G, et al. The human beta-globin gene contains multiple regulatory regions: identification of one promoter and two downstream enhancers. *EMBO J.* 1988; 7:377-384.
- Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood.* 2004; 104:3445-3453.
- Imren S, Fabry M, Westerman K, et al. High-level β -globin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114:953-962.
- Sadelain M, Lisowski L, Samakoglu S, et al. Progress toward the genetic treatment of the β -thalassemias. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1054:78-91.
- Wilber A, Hargrove PW, Kim YS, et al. Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of beta-thalassemic CD34(+) cells after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Blood.* 2011; 117:2817-2826.
- Bell A, West AG, Felsenfeld G. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* 2001; 19:447-450.
- Kunn EJ, Geyer PK. Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15:259-265.
- Emery DW, Yannaki E, Tubb J, et al. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:9150-5.
- 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.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *New Engl J Med.* 2009; 360:447-458.
- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science.* 2013; 341:1233151.
- 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.
- Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.* 2013; 341:1233158.
- 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.
- 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.
- 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.
- Modlich U, Bohne J, Schmidt M, et al. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood.* 2006; 108:2545-2553.
- Hargrove PW, Kepes S, Hanawa H. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells. *Mol Ther.* 2008; 16:525-533.
- Arumugam PI, Urbinati F, Velu CS, et al. The 3' region of the chicken hypersensitive site-4 insulator has properties similar to its core and is required for full insulator activity. *PLoS ONE.* 2009; 4:e6995.

35. Yannaki E, Emery DW, Stamatoyannopoulos G. Gene therapy for β -thalassaemia: the continuing challenge. *Expert Rev Mol Med*. 2010; 12:e31.
36. May C, Rivella S, Callegari J, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in [beta]-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human [beta]-globin. *Nature*. 2000; 406:82-86.
37. Rivella S, May C, Chadburn A, et al. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. *Blood*. 2003; 101:2932-2939.
38. Imren S, Payen E, Westerman KA, et al. Permanent and pan-erythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:14380-14385.
39. Hanawa H, Hargrove PW, Kepes S, et al. Extended β -globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a γ -globin lentiviral vector in murine β -thalassemia. *Blood*. 2004; 104:2281-2290.
40. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood*. 2004; 104:3445-3453.
41. Miccio A, Cesari R, Lotti F, et al. In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of β -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:10547-10552.
42. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science*. 2001; 294:2368-2371.
43. Roselli EA, Mezzadra R, Frittoli MC, et al. Correction of β -thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients. *EMBO Mol Med*. 2010; 2:315-328.
44. Boulad F, Wang X, Qu J, et al. Safe mobilization of CD34⁺ cells in adults with beta-thalassemia and validation of effective globin gene transfer for clinical investigation. *Blood*. 2014; 123:1483-1486.
45. Roth JC, Ismail M, Reese JS, et al. Cotransduction with MGMT and ubiquitous or erythroid-specific GFP lentiviruses allows enrichment of dual-positive hematopoietic progenitor cells *in vivo*. *ISRN Hematology*. 2012; 2012:212586.
46. Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, et al. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25:401-404.
47. Persons DA, Hargrove PW, Allay ER, et al. The degree of phenotypic correction of murine beta -thalassemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number. *Blood*. 2003; 101:2175-2183.
48. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, et al. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*. 1997; 89:2233-2258.
49. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 2001; 344:175-181.
50. Gratwohl A, Baldomero H, Schmid O, et al. Change in stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplantation*. 2005; 36:575-590.
51. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. 2006; 12:401-409.
52. Hill JM, Syed MA, Arai AE, et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:1643-1648.
53. Falzetti F, Aversa F, Minelli O, et al. Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilisation in a healthy donor. *Lancet*. 1999; 353:555.
54. Miller JP, Perry EH, Price TH, et al. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14:29-36.
55. Adler B, Salzman D, Carabasi M, et al. Fatal sickle cell crisis after granulocyte colony-stimulating factor administration. *Blood*. 2001; 97:3313-3314.
56. Kelly PF, Radtke S, von Kalle C, et al. Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol Ther*. 2007; 15:211-219.
57. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, et al. Rapid mobilization of CD34⁺ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22:1095-1102.
58. Dipersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 27:4767-4773.
59. Yannaki E, Papayannopoulou T, Jonlin E, et al. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy of adult patients with severe beta-thalassemia: results of clinical trials using G-CSF or plerixafor in splenectomized and non-splenectomized subjects. *Mol Ther*. 2012; 20:230-238.
60. Yannaki E, Karponi G, Zervou F, et al. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of G-CSF plus Plerixafor in patients with thalassemia major. *Hum Gen Ther*. 2013; 24:852-860.
61. Persons DA. Hematopoietic stem cell gene transfer for the treatment of hemoglobin disorders. *Hematology/The education program of the American Society of Hematology*. 2009:690-697.
62. Nenhuis A. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood*. 2013; 122:1556-1564.
63. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassemia. *Nature*. 2010; 467:318-322.