Talasemide Gen Tedavisi

Gene Therapy in Thalassemia

Mustafa BİLİCİ[a],
Zeynep KARAKAŞ[a]

[a]İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi,
Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi BD,
İstanbul, TÜRKİYE

Yazışma Adresi/*Correspondence:*
Zeynep KARAKAŞ
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi,
Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi BD,
İstanbul, TÜRKİYE
zeynepkar@hotmail.com

ÖZET Transfüzyon bağımlı talasemi hastalarında transfüzyon ve şelasyon konusunda birçok gelişme yaşansa da bilinen tek küratif tedavi allojenik kök hücre naklidir. En iyi sonuç tam uyumlu kardeşten yapıldığında alınmakta, diğer nakillerin (parsiyel uyumlu nakil, akraba dışı tam uyumlu donörden nakil, haploidentik nakil) morbidite ve mortalitesi daha yüksek olmaktadır. Hastaların ancak üçte birinden daha azı için HLA tam uyumlu donör bulunabilmektedir. Son iki dekatta talasemide gen tedavisi konusunda umut verici gelişmeler oldu. Fonksiyonel β-globin geni elde etme, ekleme ve gen düzenleme stratejileri üzerine çalışmalar yapıldı. Lentivirüs kullanılarak geliştirilen gen ekleme stratejilerinin başarısı kanıtlandı ve klinik çalışmalarda hastaların çoğunda transfüzyon bağımsızlığı gösterildi. Gen tedavisinin otolog kök hücre nakli ile yapılması, teorik olarak bütün hastalara uygulanabilmesini sağlamakta ve transplant ilişkili risklerin, geç yan etkilerin daha az olması beklentisini doğurmaktadır. Bununla birlikte, insersiyonel mutasyon geliştirme riski açısından uzun dönem çalışma sonuçları beklenmektedir. Bu yazıda, öncelikle globin gen yapısı anlatıldı. Daha sonra lentivirüs aracılığı ile fonksiyonel β-globin geni eklemek için vektör tasarımı, başlatılan klinik çalışmalar ve sonuçları özetlendi. Gen düzenleme stratejileri ise temelde β-globin mutasyonunun düzeltilmesi ve BCL11A üzerinden HbF'nin artırılması yöntemlerini içermektedir. Metinde, bu konunun ve klinik çalışmaların ayrıntılarına değinildi.

Anahtar Kelimeler: Talasemi; genetik tedavi

ABSTRACT Although there have been many transfusion and chelation developments in transfusion-dependent thalassemia patients, the only known curative treatment is allogeneic stem cell transplantation. The best results are obtained when it is done from a matched related donor, can be found for only less than one-third of the patients. It can be performed partially mismatched related donors, related haploidentical and matched unrelated donors, but its morbidity and mortality are higher. There have been promising developments in gene therapy for thalassemia in the last two decades. Studies on functional β-globin gene addition and gene editing strategies were conducted. The success of gene insertion strategies developed using lentivirus has been proven, and most patients have demonstrated transfusion independence in clinical trials. Performing gene therapy with autologous stem cell transplantation enables it to be applied to all patients theoretically. It raises the expectation that transplant-related risks and late side effects will be less. However, long-term study results are awaiting in terms of the risk of developing insertional mutations. In this article, first, the globin gene structure was explained. Next, the vector design for adding the functional β-globin gene with lentiviruses is explained. The clinical trials and their results were summarized. Gene editing strategies mainly include the correction of β-globin mutation and increasing HbF via BCL11A. Details of this issue and clinical trials were also mentioned in the text.

Keywords: Thalassemia; genetic therapy

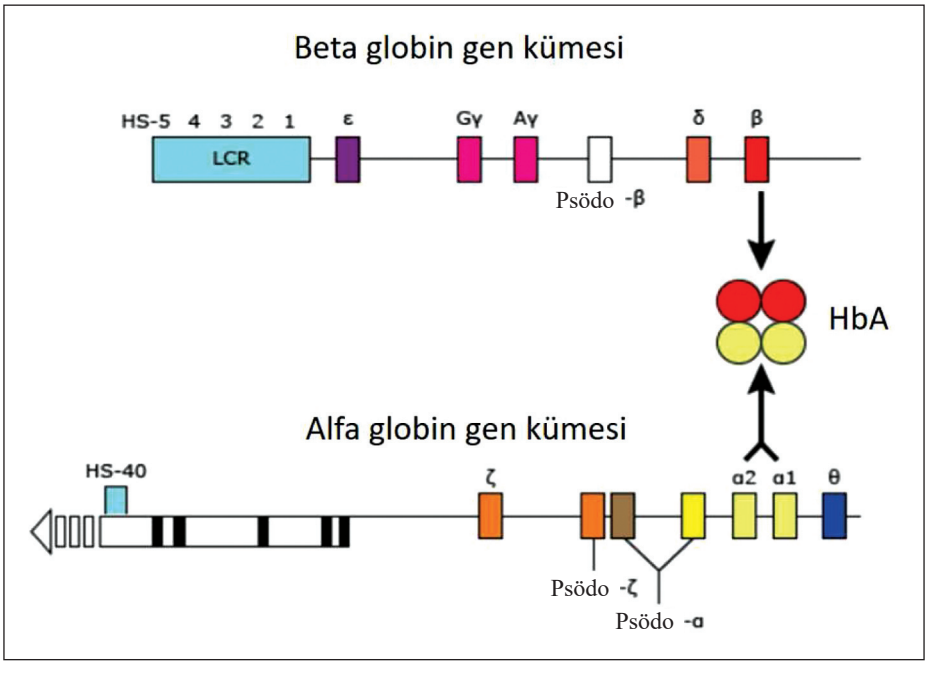
Hemoglobinopatiler dünyadaki en yaygın tek gen hastalıkları olarak bilinmekte ve tüm insanların yaklaşık %5'inde hemoglobin (Hb) bozuklukları ile ilintili genetik varyasyonlar görülmektedir. Beta (β) talasemi Akdeniz, Orta Doğu ve Asya bölgelerinde; orak hücreli anemi ise Afrika'da yaygın olarak görülse de göçler sonucunda tüm dünyada gittikçe büyüyen bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkarlar.[1] Dünya genelinde yılda 275.000 orak hücreli anemili bebek, 50.000'den fazla β talasemi majörlü bebek doğmakta; β talasemi majörlü bebeklerin 30.000'den fazlası transfüzyon

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:
Bilici M, Karakaş Z. Talasemide gen tedavisi. Antmen AB, editör. Talasemi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.87-97.

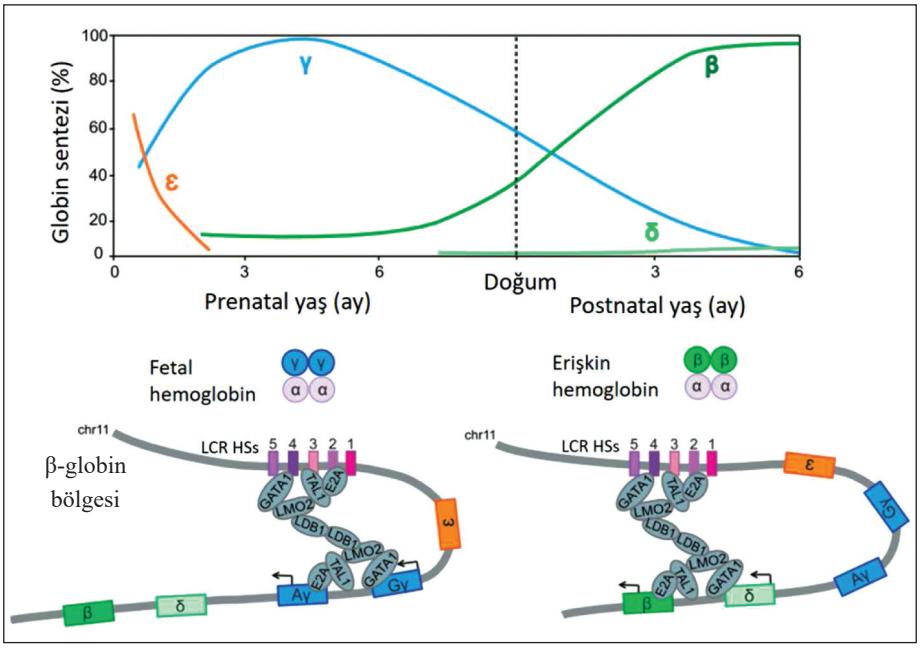
bağımlı olmaktadır.[2] B talasemi majörlü hastalar tedavisiz kaldığında derin anemi geliştirerek ilk dekatta kaybedilirler. Yaklaşık 50 yıldır uygulanan standart tedavi; hayat boyu transfüzyon ve demir şelasyonudur. Hastalar iyi takip edildiğinde normal yaşam sürelerine yakın hayatlar mümkün olsa da tedavi uyumu farklı sebeplerle her zaman sağlanamamaktadır. Tekrarlayan transfüzyonlar ve yetersiz şelasyona bağlı komplikasyonlar gelişmekte, gelişmiş ülkelerde bile hastaların yarısına yakınında ciddi morbidite ve mortalite gözlenmektedir.[3] Bilinen tek küratif tedavi allojenik kök hücre naklidir. 1980'lerin başından itibaren uygulanmaya başlanan bu tedavide, yıllar içinde tekniklerin ve teknolojinin gelişmesi ile %90'ın üzerinde başarı sağlanmıştır.[4] Talasemiye bağlı komplikasyonlar gelişmeden (demir yüküne bağlı organ disfonksiyonları, transfüzyonlara bağlı enfeksiyonlar), erken dönemde hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HSHT) yapıldığında iyi yanıt alındığı bilinmektedir.[4] Her yıl dünyada 50.000 hastaya talasemi majör tanısı konulmasına rağmen %75 vakada HLA uygun donör bulunamamakta ve ancak %10 vakaya (5.000-10.000 vaka) HSHT uygulanabilmektedir.[4,5] HLA uygun kardeş donör bulunamaması ve sadece küçük yaştaki hastalara önerilmesi nedeni ile HSHT ile kür şansı çoğu hasta için sağlanamamakta ve bu nedenle diğer küratif tedavilere ihtiyaç bulunmaktadır.[1] 2000 yılında Sadelain ve ark. tarafından fare deneylerinde lentivirüs kullanılarak β-globin genlerinin kök hücrelere başarılı şekilde transdüksiyonunun gösterilmesi ile talasemide gen tedavisi konusunda önemli bir adım atılmıştır.[6] Gen tedavisi, otolog kök hücre nakli ile yapılması nedeni ile teorik olarak bütün hastalara uygulanabilir ve transplant ilişkili riskler daha düşüktür.[7] Son yedi yıl içerisinde birçok klinik çalışma başlatılmış olup, ticari ve ulaşılabilir hâle getirilmeye çalışılmaktadır.

GLOBİN GEN YAPISI VE DÜZENLENMESİ

Hemoglobin; 2 alfa (α) ve 2 beta (β) globin zincirinden oluşan tetramerik yapıda bir proteindir. Beta gen kümesi, 11. kromozom kısa kolu üzerinde yer alan 70 kilobaz (kb) uzunluğunda bir bölgedir. Embriyonik (epsilon), fetal [A (gamma-γ), G (γ)] ve erişkin (delta-δ ve β) globin genlerini kodlar. Alfa gen kümesi ise 16. kromozom kısa kolu üzerinde yer alır ve 40 kb uzunluğundadır. Embriyonik (zeta) ve iki kopya α (α1 ve α2) globin genini kodlar (Not: 1 kilobaz= 1.000 nükleik asit) (Şekil 1).[8,9] Her bir gen kümesi içerisinde, kodlama yapmayan alanlar ile birlikte, birçok düzenleyici bölge mevcuttur. Bunlardan promoter bölge; mRNA polimeraz bağlanma bölgesidir ve transkripsiyonun başlatılması için gereklidir. Artıcı (enhancer) ve azaltıcı (silencer) bölgeler; etkileşim içerisinde oldukları transkripsiyon faktörlerine göre globin gen sentezini etkilerler.[9] En önemli düzenleyici alan ise 16 kb uzunluğundaki lokus kontrol bölgesi [locus control region (LCR)]'dir. LCR eritroid maturasyon gelişirken birçok transkripsiyon



ŞEKİL 1: Globin gen yapısı.[9]
LCR: "Locus control region".

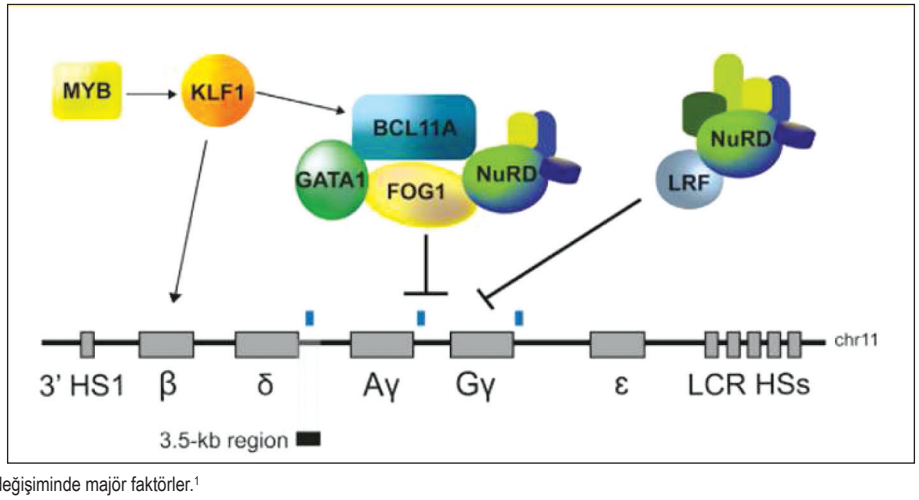


ŞEKİL 2: İnsan β-globin genlerinin gelişiminin düzenlenmesi.[1]

Beş farklı β benzeri globin geni vardır. ε-globin embriyonik dönemde eksprese edilir ve fetal dönemde yerini γ-globine bırakır. Doğum döneminde gama ◊ β Hb değişimi gerçekleşir ve erişkin yaşamda da devam eden β Hb ağırlıklı olarak sentezlenir. Erişkin δ-globini ise zayıf bir şekilde ifade edilir. Pentamerik yapıdaki bir bölge, LCR ve γ ve β globin arasında etkileşimler ile düzenlenmeleri sağlanır.

LCR: "Locus control region".

faktörü (promoter bölge, artırıcı ve azaltıcı bölgeler) ile etkileşim göstererek kromatinlerin açılması ve DNAse duyarlı bölgelerin aktifleştirilmesinde görev alır ve transkripsiyonu artırır. Beş adet DNAse 1 hipersensitif alan mevcuttur ve globin genlerinin ekspresyonu için LCR'nin normal fonksiyon göstermesi mutlak gereklidir.[8-10] Beta-globin genleri; ε, γ, β, δ sırasıyla eksprese olurlar. İntrauterin hayatın sonlarına doğru fetal gama globulin sessizleşir ve erişkin β-globin geni baskın hâle gelir, bu durum, "γ à β Hb değişimi" (globin switching) olarak adlandırılır.[11] LCR ile globin promoter bölgelerinin etkileşim ve düzenlenmelerinin sağlanmasında pentamerik bir kompleks (GATA1, TAL1, E2A, LMO2, ve LDB1) görev alır (Şekil 2).[1,12] Bir diğer önemli transkripsiyon faktörü çinko par-



ŞEKİL 3: γ ⇑ β Hb değişiminde majör faktörler.[1]

BCL11A ⇑ SOX6, GATA1, FOG1, NuRD üzerindeki etkisi ile γ globin ekspresyonunu baskılar. MYB KLF1'i uyarır, KLF1 de BCL11A'nın etkisini pozitif etkileyerek düzenler. Ayrıca KLF1 direkt etki ile de β-globin ekspresyonunu sağlar. Bir transkripsiyon faktörü olan LRF, NuRD kompleksi üzerinden γ-globin ekspresyonunu baskılar.

mak (zinc-finger) yapısında olan BCL11A'dır. Net etkisi postnatal yaşamda γ globin sentezini durdurmaktır. GATA1, SOX6, FOG-1 ve NuRD etkileşimleri ile bu düzenlenme sağlanır (Şekil 3).[1,12] Ayrıca B lenfositlerin maturasyonunda ve immün fonksiyonlarda da görevleri olduğu bilinmektedir.[13] Bunların dışında gama à β Hb değişiminde görev alan birçok nükleer faktör [erythroid Kruppel-like factor (KLF), MYB, TR2/TR4 ve COUP-TFII] ve kromatin yeniden düzenlenmesinde etkili faktörler [EHMT1/2, CHD4, DNMT1, LSD1 ve LIN28B-let7 microRNA yolağı] de mevcuttur.[1,12]

Beş farklı β benzeri globin geni vardır. ε-globin embriyonik dönemde eksprese edilir ve fetal dönemde yerini γ-globine bırakır. Doğum döneminde gama à β Hb değişimi gerçekleşir ve erişkin yaşamda da devam eden β Hb ağırlıklı olarak sentezlenir. Erişkin δ-globini ise zayıf bir şekilde ifade edilir. Pentamerik yapıdaki bir bölge, LCR ve γ ve β globin arasında etkileşimler ile düzenlenmeleri sağlanır.

BCL11A à SOX6, GATA1, FOG1, NuRD üzerindeki etkisi ile γ globin ekspresyonunu baskılar. MYB KLF1'i uyarır, KLF1 de BCL11A'nın etkisini pozitif etkileyerek düzenler. Ayrıca KLF1 direkt etki ile de β-globin ekspresyonunu sağlar. Bir transkripsiyon faktörü olan LRF, NuRD kompleksi üzerinden γ-globin ekspresyonunu baskılar.

HbVar (A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias) kayıtlarına göre, şu ana kadar talasemi hastalığı için bildirilen 506 adet mutasyon mevcuttur. Bunların 300'den fazlası β-talasemi için bildirilmiştir.[14,15] α talasemilerde çoğunlukla delesyon şeklinde, β-talasemilerde ise nokta mutasyonu şeklinde işlev kaybettirici mutasyonlar gözlense de yukarıda anlatılan globin gen ekspresyonunun her aşamasını etkileyen mutasyonlar görülebilmektedir. β-globin gen mutasyonları iki büyük gruba ayrılır. Birinci grupta sadece β-globin sentezi etkilenmiştir (HBB mutasyonu) ve basit talasemi olarak adlandırılır. Kompleks talasemi olarak adlandırılan ikinci grupta ise β-globin geni ve β-globin gen kümesinden farklı diğer genlerin de etkilenmesi (LCR, artırıcı/azaltıcı bölgeler vb.) söz konusudur.[12]

GEN TEDAVİSİ

Yapısal hemoglobinopatiler ve talasemilerde HSHT ile kür sağlanabilse de hastaların büyük kısmı için tam uyumlu donör bulunamadığından, çoğu hasta için kür sağlanamamaktadır. Ayrıca HSHT'ye bağlı yüksek morbidite ve mortalite mevcuttur; "Graft versus host disease (GVHD)", hazırlama rejimlerine bağlı organ toksisiteleri, uzun süren ciddi sitopeniler, enfeksiyonlara yatkınlık ve birçok diğer yan etkiler görülebilmektedir.[16,17] Gen tedavisi; hastanın kendi kök hücrelerinin toplanması ve allojenik nakle ait riskleri içermemesi nedeni ile gelecek için büyük ümit taşımaktadır.

Gen nakli için öncelikle yeterli miktarda $CD34^+$ hematopoietik kök hücrelerin [hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs)] toplanması gerekmektedir. Talasemide inefektif eritropoeze bağlı artmış eritroid diferansiyasyon, polikromatofilik evrede maturasyon duraklaması ve eritroid prekürsörlerin erken ölümü ile kemik iliği içerisinde normalden altı kat fazla eritroid prekürsör bulunmaktadır. Bu değişiklikler sonucunda geleneksel yöntemler (iliak kanattan multipl örnekler alınması) ile $CD34^+$ hücre toplanılması başarısız olabilmektedir.[1] Talasemi hastalarında gen tedavisi prosedürü için HSPCs mobilizasyonu önerilmektedir.[18] Bu amaçla günümüzde önerilen yöntem; "granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)" ve pleriksafor (Mozobil) birlikte kullanımıdır. Plerixafor; kemik iliği stromal hücrelerinde bulunan SDF-1α (stromal cell-derived factor-1-alpha)'nın CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)'e bağlanmasını engelleyerek HSPCs'nin perifere mobilizasyonunu sağlar. Bir aferez ile yüksek sayıda $CD34^+$ hücre toplanılmasına imkân sağladığı gösterilmiş olup, bazı çalışmalarda sadece pleriksafor ile de yeterli sayıda HSPCs elde edildiği gösterilmiştir.[19,20]

Gen tedavisi uygulanırken öncelikle yeterli HSPCs elde edilmeli, daha sonra laboratuvar şartlarında genetik modifikasyon gerçekleştirilmeli ve HSHT hazırlama rejimleri ile yeterli miyeloablasyon sağlandıktan sonra hastaya geri verilmelidir (Şekil 4).[21,22]

GEN TEDAVİSİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Gen tedavisinde temelde iki farklı yöntem kullanılmaktadır:

1. Globin geni ekleme;

a. Fonksiyonel β-globin geni,

b. Fonksiyonel γ-globin geni.

2. Gen düzenleme;

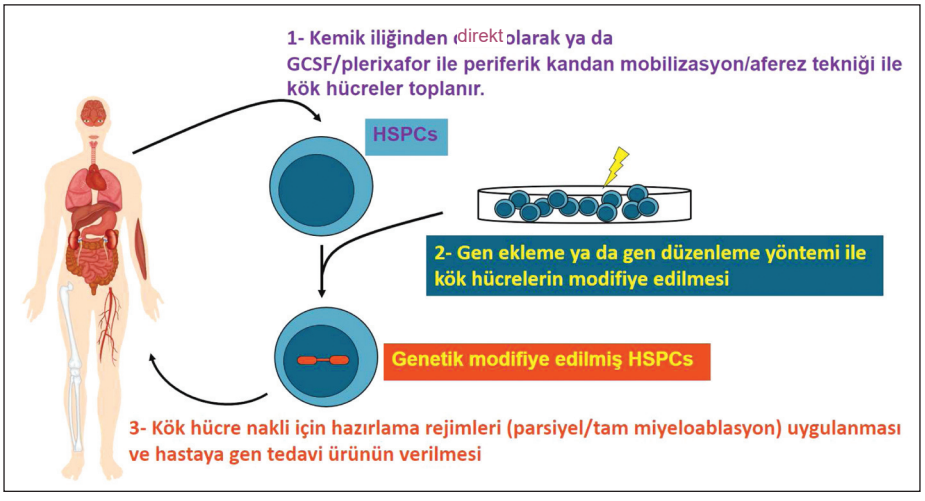
a. β-globin mutasyonunun düzeltilmesi,

b. HbF artırılması (BCL11A).

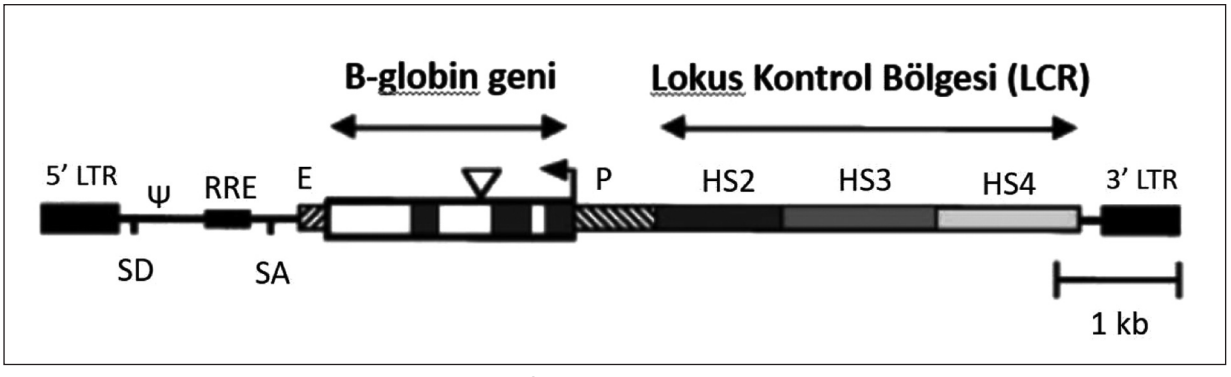
1. GLOBİN GENİ EKLEME

a) Fonksiyonel β-globin Geni

Lentivirüsler ile vektör tasarımı: Gen naklinde lentivirüslerin geliştirilmesi ve β-globin ekspresyonunda LCR bölgesinin öneminin keşfi iki majör buluştur.[1,23] Başarılı bir globin lentiviral vektörü; promoter, intron, exon, enhancer ve LCR bölgelerinin önemli ve etkin kısımlarının kombinasyonunu içermelidir.[24] Sadelain ve ark. 1990'lı yıllarda başlayan bir-



ŞEKİL 4: Gen tedavi yaklaşımı.[21,22]
HSPCs: "Hematopoietic stem/progenitor cells".

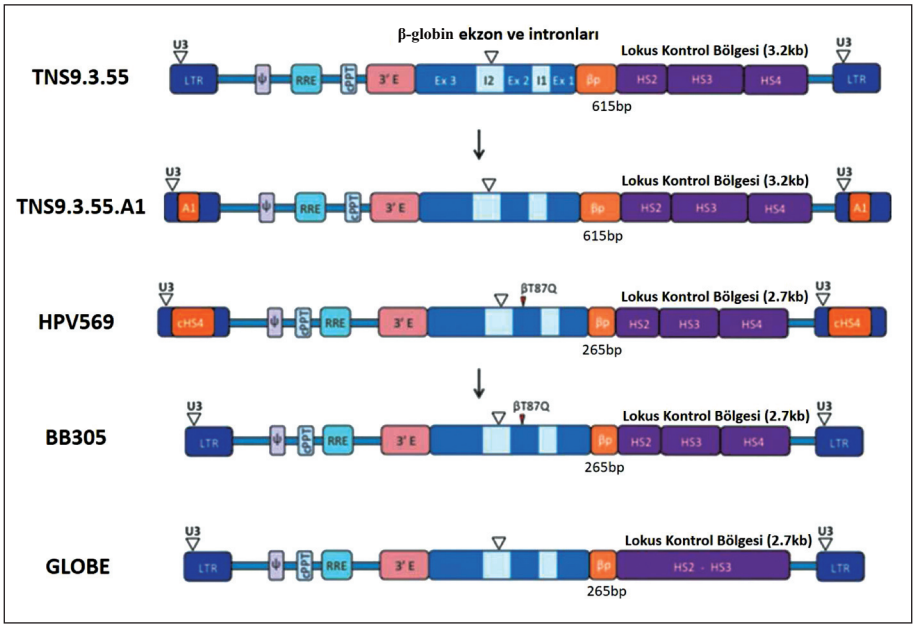


ŞEKİL 5: TNS9 vektör tasarımı.[6]

çok lentiviral vektör tasarımlarından sonra fareler üzerinde ilk başarılı gen naklini 2000 yılında TNS9 vektörü ile gerçekleştirdiler[6] Vektör ayrıntılı olarak Şekil 5'te şematize edilmiş olup; β-globin gen bölgesi, LCR (HS2, HS3, HS4), promoter, gen ekleme alıcı bölgesi (splice acceptor), gen ekleme verici bölgesi (splice donor) genetik parçalarından oluşur.[6] 2003 yılında ciddi anemisi, masif splenomegalisi, ekstramedüller hematopoez bulguları ve karaciğer demir birikimi olan 60 günlük β^0 talasemi majör fareye TNS9 ile nakil yapıldı ve bulguların gerilediği gösterildi.[25] Geniş fare kohort çalışmalarında ve devamındaki diğer hayvan modellerinde lentivirüs aracılığı ile TNS9'un aktarılmasının başarılı olduğu gösterildi.[24]

- LCR (HS2,HS3,HS4)
- Human β-globin promoter (P)
- β-globin genine ait exon ve intronlar (dolu ve boş kutu şekilleri)
- 3' β-globin enhancer (E)
- Gen ekleme alıcı bölgesi (Splice acceptor SA)
- Gen ekleme verici bölgesi (Splice donor SD)
- Paketleme bölgesi (ψ),
- Rev-response element (RRE)

Vektör tasarlanması ve seçimindeki en kritik aşama vektörün güvenliğidir. Retrovirüs ile yapılan çalışmalarda insersiyonel onkogenez gelişebildiği gösterilmiş olup, X'e bağlı ağır kombine immün yetmezlik ve Wiskott-Aldrich sendromlu hastalarda, immün fonksiyonlar normale geldikten ve tedavinin ikinci yılından sonra lösemi geliştiği bildirilmiştir.[26,27] Bu vektörlerin aksine globin vektörlerinin eritroid spesifik olması, kök hücrelerin lenfoid progenitör bölgesinde görev almaması ve eritroid maturasyonda geç evrelerde, enükleasyondan hemen önce, aktive olması özellikleri ile doğal bir koruma sağlanır.[24] TNS9 ile gen tedavisi uygulanan 300'den fazla primer ve sekonder gen tedavi alıcısı fare üzerindeki çalışmalarda, fareler 12-20 ay kadar izlenmiş olup bir vakada bile lösemi gelişmemiştir.[24] İzleyen yıl-



ŞEKİL 6: Geliştirilen lentiviral vektörler.[24]

larda farklı merkezlerde klinik çalışmalar başlatılmış olup, TNS9 varyantı vektörler geliştirilmiştir. Şekil 6'da, bu vektörlerin ayrıntıları görülebilmektedir.[24,28]

KLİNİK ÇALIŞMALAR

β talasemide ilk faz 1 klinik çalışması HPV569 vektörü kullanılarak 2006 yılında Fransa'da başlatıldı (LG001) (Şekil 6). HPV569 vektörü; γ-globinden elde edilen (β^{T87Q}) ve HbS polimerizasyonunu engelleyen bir β-globin gen bölgesini eksprese etmekteydi. β-globin gen bölgesi (β^{T87Q}), minimal β-globin promoter bölgesi, LCR bölgesine ait HS2, HS3 ve HS4 bölgeleri, iki adet cHS4 (chicken β-globin HS4) bölgesi (kromatin izolasyonunu ve LCR komşu bölgelerindeki artırıcı genlerin etkisini azaltmak için) içermekteydi. İlk vaka; 18 yaşında erkek, transfüzyon bağımlı β^{E}/β^{0} talasemi hastası idi. İlk kez 3 yaşında, Hb 6,7 g/dL ve majör hepatosplenomegalisi nedeni ile transfüzyon programına alınan hastaya, izleyen yıllarda 157 mL/kg/yıl eritrosit transfüzyonu uygulandı. Altı yaşında splenektomi yapıldı. Splenektomiye rağmen Hb seviyesi 4 g/dL seviyesine kadar düşüyordu. Sekiz yaşında deferoksamin ile şelasyon başlandı. HLA uygun donörü olmaması nedeni ile gen tedavi programına alındı. Hazırlama rejimi olarak miyeloablatif dozda busulfan (12,8 mg/kg) kullanıldı, mobilizan ajan olarak pleriksafor + G-CSF kullanılarak kök hücreler toplandı ve Haziran 2007 tarihinde gen tedavisi uygulandı. Yeni kök hücrelerin, kemik iliğinde kademeli şekilde artarak etkinleştiği görüldü ve hasta, bir yılın sonunda transfüzyon bağımsız hâle geldi (son transfüzyon Haziran 2008). İlk bir yıllık izlemde Hb 8-9 g/dL olarak izlendi, 17. aydan sonra transfüze edilen HbA saptanmadı ve HbA^{T87Q} (genetik ürünü içeren hemoglobin), endojen HbF ve HbE'nin yaklaşık eşit oranlarda olduğu görüldü. Gen tedavisi sonrasında integrasyon bölgesi analiz edildiğinde HMGA2 bölgesinde klonal dominans olduğu gösterildi. Ayrıca sadece eritrositlerde değil, granülosit ve monositlerde de aynı aktivite gösterildi, lenfositlerde saptanmadı. Bu gen bölgesinin vektör kaynaklı anormal transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel değişiklikler ve eklemeler ile geliştiği değerlendirildi. HMGA2 gen bölgesinin, bazı benign tümörlerde (lipom) ve PNH'de overekspresyonu olduğu bilinmekte. Bu hastada yıllar içinde anormal HMGA2 klonunun gerilediği görüldü. Yaklaşık 10 yıllık izlemde, hastanın aralıklı transfüzyon ihtiyacı olmakta.[1,29] LG001 çalışmasında aslında üç hasta çalışmaya alındı ama sadece tanımlanan hasta başarılı oldu.[28] HPV569'un transfüzyon bağımsızlığını sağlayacak kadar hemoglobin yükselmesini sağlamaması, beklenmedik şekilde HbF yüksekliği sağlaması ve klinik olarak lösemiye dönmeyen ve kendiliğinden gerileyen HMGA2 klonu varlığı nedenleri ile yeni bir vektör tasarlandı; BB305.[24]

İlk kez TNS9'u geliştirerek fare çalışmalarını gösteren Sadelain ve ekibi ise Haziran 2012'de New York klinik çalışmasını başlattı. Vektör olarak TNS9.3.55 kullanıldı. Bu çalışmada, hazırlama rejimi olarak nonmiyeloablatif dozda busulfan (8 mg/kg) kullanıldı. Çalışmaya, β^{0}/β^{+} genotipinde dört hasta alındı. Tedavi sonrası öncelikle transfüzyon ara-

lıkları açılsa da bu hastalar transfüzyon bağımlı oldular. Non-miyeloablatif dozun gen tedavisinde yeterli engraftmanı sağlamadığı gösterilmiş oldu.[28] Bu iki çalışma sonrasında, daha yüksek hasta sayıları ile diğer klinik çalışmalar planlandı ve miyeloablatif dozda hazırlama rejimleri kullanıldı (busulfan 12,8 mg/kg, treosulfan 42 g/m^2 , tiotepa 8 mg/kg).[28]

Fransa ekibi BB305'i geliştirmişti. BB305'in HPV569 ile farkı; cHS4 bölgelerini içermemesi ve daha iyi vektör üretilmesini sağlamak için 5' bölgesindeki LTR (long-terminal repeat) bölgesinin CMV promoter bölgesi ile değiştirilmesidir (Şekil 6).[1,28] Bu vektör ile Ağustos 2013 tarihinde, HGB-204 uluslararası çok-merkezli çalışması ve HGB-205 Fransa'da tek merkezli faz 1/2 çalışması başlatıldı. Bu çalışmaya, ilk kez fenotipik olarak ağır talasemi hastaları alındı (Dokuz hasta, β^0/β^0 ya da homozigot IVS-1 mutasyonu içeriyordu). Dokuz hasta β^E/β^0, dört hasta da diğer genotiplerde idi. LG001 çalışmasına göre üç dört kat daha yüksek vektör sayısı kullanıldı. Toplam 22 hasta bu iki çalışmaya katıldı (HGB 204, 205), 15'i transfüzyon bağımsız oldu. Ağır fenotipli dokuz hastadan dördü transfüzyon bağımsız oldu, beşinde ise yıllık transfüzyon ihtiyacı %73 azaldı. Non-β^0/β^0 genotipli 13 hastadan 12'si transfüzyon bağımsız oldu. Vektör integrasyonuna bağlı klonal dominans görülmedi [30]. Bu çalışmada, ilaç içerisindeki vektör sayısının (vector copy number (VCN)] yüksek tutulması ile eritroid prekürsörleri içerisindeki VCN'nin korele olduğu ve kandaki HbA^{T87Q} seviyesini belirlemede ana faktör olduğu değerlendirildi (VCN: HGB 204: 0,7 (0,3-1,5; HGB 205: 1,3 (0,8-2,1).[30]

Diğer bir Faz 1/2 çalışması ise İtalya'da Mayıs 2015 tarihinde başlatıldı. GLOBE vektörü kullanıldı. Bu vektörün farkı ise LCR bölgesinde HS4 içermemesiydi (Şekil 6). Hazırlama rejimi olarak miyeloablatif dozda ama daha az toksisite gelişeceği nedeni ile treosulfan 42 g/m^2 ve tiotepa 8 mg/kg kullanıldı ve genetik modifiye hücreler retiküloendotelyal sistemde tuzaklanmasını engellemek için direkt olarak kemik iliği içerisine uygulandı. Çalışmaya dokuz hasta alındı. Üç hasta erişkin, altı hasta ise çocuk idi (ortalama yaş 9). Erişkin hastalarda transfüzyon ihtiyacı azaldı. Çocuk hastalardan değerlendirmeye alınabilen dördünden üçü transfüzyon bağımsız oldu. Bu çalışmada, daha düşük yaşta ve daha yüksek VCN'nin tedavi etkinliğini artırdığı gösterildi[31]

Bluebird Bio firması; HGB 207 (Haziran 2016) ve HGB 212 (Haziran 2017) çalışmaları ile faz 3 gen tedavi çalışmalarına başladı. HGB 207 non-β^0/β^0, HGB 212 β^0/β^0 ya da IVS-I-110 hastaları için tasarlandı. HGB 207'de VCN= 3,2 (1,9-5,6); HGB 212'de VCN= 2,5 (1,2-4,3) olarak uygulandı. Haziran 2019 EHA Kongresi verilerine göre HGB 207 çalışmasında 20 hastadan 17'si; HGB 212 çalışmasında ise 11 hastadan altısı transfüzyon bağımsız oldu.[28,32,33]

Önemli bir gelişme de Mart 2019 tarihinde Bluebird Bio firmasının gen tedavi ürünü olan ZYNTEGLO™ (autologous $CD34^+$ cells encoding bA-T87Q-globin gene)'nun "Europen Medicines Agency (EMA)" tarafından onaylanmasıdır. On iki yaşın üzerindeki non-β^0/β^0 genotipli transfüzyon bağımlı talasemi hastalarında HLA uygun donör yokluğunda uygulanabileceği belirtildi.[28] Tablo 1 de, tüm çalışmalar özetlenmiştir.

b) Fonksiyonel γ-globin Geni

Gen tedavisinde diğer bir strateji HbF düzeyinin artırılmasıdır. γ-globin seviyesinin artması, β-globin eksikliğini kompanse eder ve anemiyi düzeltir. β talasemide α-globin presipitasyonunu engelleyerek, orak hücreli anemide HbS polimerizasyonunu engelleyerek klinik olarak yarar sağladığı bilinmektedir. BCL11A (B cell CLL/lymhoma 11A) HbF ekspresyonunda majör düzenleyicidir. Postnatal yaşamda γ-globin sentezini durdurmaktadır. Lentivirüsler içerisinde BCL11A'ya spesifik shRNA ekspresyonu sağlanarak terapötik etki sağlanması üzerine çalışmalar vardır. Bu yaklaşım ile eritrositler içerisindeki BCL11A seviyesi %90 azaltılır, γ-globin sentezi üzerindeki baskı ortadan kaldırılır ve total Hb içerisindeki HbF oranının %70'e ulaşması sağlanarak oraklaşma gelişmesi önlenir. Daha çok orak hücreli anemi tedavisinde yeri olması düşünülen bu stratejide hayvan çalışmaları devam etmektedir.[1,34]

Lentivirüs aracılı diğer bir strateji ise özel bir çinko-parmak (ZF) proteini üretilmesidir. Bu protein ile γ-globin proteinleri ve LCR bölgesi arasında LDB1 aracılığı ile bir döngü kurulması sağlanır ve endojen γ-globin üretimi sürekli olarak sağlanmış olur (Şekil 2). Preklinik çalışmalar devam etmektedir.[1]

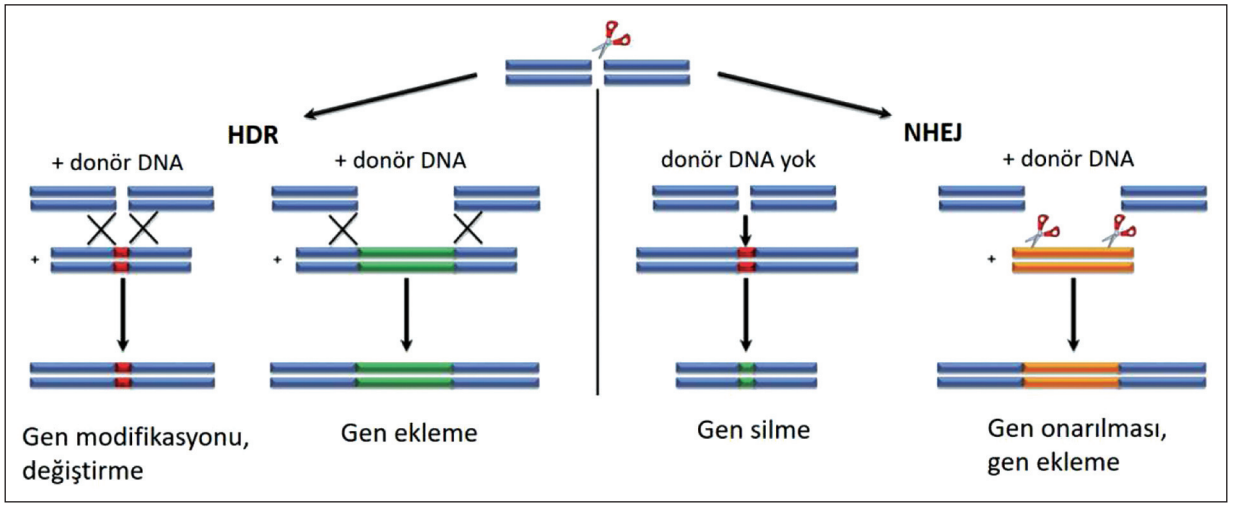
2. GEN DÜZENLEME

Gen düzenleme teknolojilerinde son 20 yılda çok güzel gelişmeler oldu. ZFNs (Zinc finger nucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases), CRISPR/Cas9 (the clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated nuclease Cas9) teknolojileri ile in vivo ve in vitro birçok farklı dokuda genetik modifikasyon sağlanmıştır. Bu sistemlerin her birinin DNA integrasyonunu sağlayan ve nüklease ile hedeflenen bölgeden kesmeyi sağlayan yapıları vardır. Şekil 7'de şematize edildiği üzere öncelikle DNA her iki zincirinde boşluklar oluşturulur. Bu boşlukların doldurulması için iki farklı yöntem vardır; "homology-directed repair (HDR)" ve "non- homologous end-joining (NHEJ)". HDR'de ekzojen kalıp DNA kullanılarak yüksek doğrulukta tamir gerçekleştirilir. NHEJ'de ise daha çok kalıcı gen inaktivasyonu sağlanır ve normal hücre

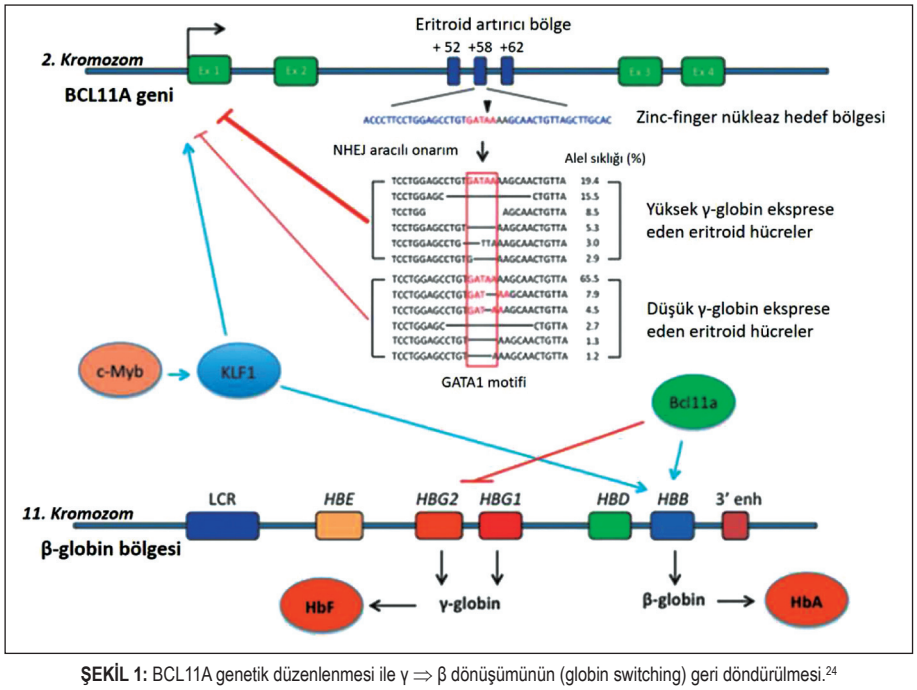
TABLO 1: Talasemide gen tedavisi klinik çalışmaları.[28]

Çalışmanın adı ve faz	Sponsor	Ülke	Başlama tarihi	Vektör	Hasta sayısı ve yaşı	Genotip	Graft kaynağı	Hazırlama rejimi	Uygulama Yolu	Sonuç
LG001, FAZ 1/2	Bluebird Bio	Fransa	Eylül 2006	HPV569	3 18-22 yaş	Non-β^0/β^0	Kİ, mPB (Plrxfr + G-CSF)	Busulfan 12,8 mg/kg	i.v.	1 transfüzyon bağımsız hasta
NCT01639690 Faz I	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Amerika	Temmuz 2012	TNS9.3.55	4 18-23 yaş	Non-β^0/β^0, β^0/β^0	mPB (G-CSF)	Busulfan 8 mg/ kg	i.v.	Transfüzyon sıklığında azalma
NCT01745120 HGB-204 Faz I/II	Bluebird Bio	Global	Ağustos 2013	BB305	18 12-35 yaş	Non-β^0/β^0 (n=10), β^0/β^0 (n=8)	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12,8 mg/kg	i.v.	Non-B0/B0: 8 B0/B0:3 hasta transfüzyon bağımsız
NCT02151526 HGB-205 Faz I/II	Bluebird Bio	Fransa	Ağustos 2013	BB305	4 16-18 yaş	Non-β^0/β^0 (n=3), β^0/β^0 [IVS1-110 homozigot](n=1)	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12,8 mg/kg	i.v.	4 hasta transfüzyon bağımsız
NCT02453477 TIGET-BTHAL Faz I/II	Telethon Foundation	İtalya	Mayıs 2015	GLOBE	9 6-35 yaş	Non-β^0/β^0 (n=7), β^0/β^0 (n=2)	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Treosulfan 42 g/m2, tiotepa 8 mg/kg	Kemik iliği	Erişkinlerde transfüzyon sıklığında azalma, 3 çocuk hasta transfüzyon bağımsız (1'i B^0/B^0)
NCT02906202 HGB-207 Faz III	Bluebird Bio	Global	Temmuz 2016	BB305	20 8-34 yaş	Non-β^0/β^0	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12,8 mg/kg	i.v.	17 transfüzyon bağımsız hasta
NCT03207009 HGB-212 Faz III	Bluebird Bio	Global	Haziran 2017	BB305	11 < 50 yaş	β^0/β^0 ya da IVS1-110 homozigot	mPB (Plrxfr+G-CSF)	Busulfan 12,8 mg/kg	i.v	6 transfüzyon bağımsız hasta
NCT03432364 ST-400-01 Faz I/II	Sangamo Therapeutics/ Bioverativ Therapeutics Inc	Amerika	Mart 2018	ZFN (BCL11A enhancer)	6 18-40 yaş	TDT	mPB	Busulfan		1 hasta muhtemelen transfüzyon bağımsız
NCT03655678 CTX001-111 Faz I/II	Vertex Pharmaceuticals Inc/ CRISPR Therapeutics	Kanada Almanya İngiltere	Eylül 2018	CRISPR/Cas9 (BCL11A enhancer)	12 18-35 yaş	Non-β^0/β^0		Busulfan		Devam ediyor

mPB: Mobilize periferik kan, Kİ: Kemik iliği.



ŞEKİL 7: Gen düzenleme mekanizması; "homology-directed repair (HDR)" ve "non-homologous end-joining (NHEJ)".[28]



ŞEKİL 1: BCL11A genetik düzenlenmesi ile γ ⇒ β dönüşümünün (globin switching) geri döndürülmesi.[24]

döngüsündeki DNA'nın kendiliğinden tamir mekanizmaları ile onarılması gerçekleşir, kalıp DNA gerektirmez. Bu yöntemler ile β hemoglobinopatilerde güvenli tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Genellikle NHEJ'yi baz alan yaklaşımlar daha etkilidir, ancak hataya açıktır ve sonuçları kontrol edilemez, HDR spesifik hedefe yönelik değişikliklere izin verir.[1,24,35]

Gen düzenlemede iki farklı strateji izlenmektedir. β-globin gen tamiri ve γ-globinin yeniden aktive edilmesi.

a) HBB gen tamiri: ZFNs, TALENs ve CRISPR/Cas9 sistemleri ile β-globin gen tamiri tasarlanmıştır. Plazmid DNA'sı, HBB içine integre olmadan genetik materyal iletmede aracı lentivirüsler ve tek zincirli oligodeoksinükleotidler gibi genetik materyaller aracılığı ile spesifik mutasyon bölgelerinin tamiri çalışılmaktadır. Ancak, şu ana kadarki çalışmalarda kök hücrelerin ancak %1'inde uzun dönemde bu genetik modifikasyon sebat edebilmiştir. Bu nedenle preklinik çalışmalar devam etmektedir.[24,36]

b) HBG gen reaktivasyonu: Orak hücreli anemi ve β talasemi hastalarının bazılarında herediter HbF yüksekliği (HPFH) tanımlanmış olup, bu hastaların klinik olarak daha hafif seyrettiği bilinmektedir. γ-globin sentezinin artması ile

eritropoezde iyileşme sağlanır. Genetik yaygınlık ve klinik korelasyon çalışmalarında, HPFH olgularındaki varyant mutasyonların; β-globin gen kümesinde, kromozom 2 üzerindeki BCL11A'da ve kromozom 6 üzerindeki HBS1l-MYB bölgesinde olduğu gösterildi.[24,37] BCL11A'nın postnatal yaşamda γ-globin sentezini durdurduğu daha önce açıklanmıştı. Şekil 8'de şematize edildiği gibi; kromozom 2 üzerindeki BCL11A geninin eritroid artırıcı (eritroid enhancer elements) elemanların olduğu yerden, +58 bölgesinden ZF ile kesildiğinde GATA1 transkripsiyon faktörü kesilmiş olur. Böylece BCL11A düzeyi azalır ve γ-globin ekspresyonu sağlanır.[38] Benzer bir çalışma, CRISPR/Cas9 sistemi ile de tasarlanmıştır.[39] 2018 yılında BCL11A enhancer etki mekanizması ile iki adet faz 1 klinik çalışma başlatılmıştır. Bir tanesi ZFN, diğeri CRISPR/Cas9 sistemi kullanarak hasta almaya başladılar, sonuçları bekleniyor.[28]

SONUÇ

Son 20 yıl içinde talasemide gen tedavisi konusunda önemli mesafe katedilmiş ve son sekiz yıl içerisinde birçok klinik çalışma peş peşe gelmiştir. Farklı yöntemlerle gen tedavisi yukarıda açıklanmış olsa da şu anda lentivirüsler aracılığı ile yapılan uygulamanın HSPCs'leri etkili şekilde hedef olarak seçtiği ve başarılı olduğu gösterilmiştir. Özellikle daha hafif genotipe sahip hastalarda transfüzyon bağımsızlığı gösterilmiş olup, gelecekte kür sağlanması için büyük umutlar vadetmektedir. Geniş kohort grup çalışmaları ve uzun dönem izlem çalışmaları yapılmasına ihtiyaç vardır. Yüksek VCN ile daha iyi klinik sonuçlar alınmıştır, ancak bu durum, insersiyonel mutasyonlar için uzun dönemde risk teşkil etmekte, uzun dönem çalışma sonuçları beklenmektedir. Coquerelle ve ark.nın ortalama maliyet hesaplama çalışmasında HSHT 215.571 €, gen tedavisi ise 608.086 € şeklinde hesaplanmış olup, %48'i vektör eldesi içindir.[5] Gelecekte gen tedavisi daha uygun maliyetlerle yaygınlık kazandığında, hastaların bu tedavileri alabilmesi ve kür sağlanabilmesi için bugün geleneksel tedavilerin çok iyi uygulanması gerekmektedir.

Önemli Not: Tüm şekiller kaynak gösterilerek yeniden oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene Therapy for β-Hemoglobinopathies. Molecular Therapy. 2017;25(5):1142-54.
2. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bulletin of the World Health Organization. 2008;2008(6):480-7.
3. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio G, et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. Haematologica. 2004; 89(10):1187-93.
4. Srivastava A, Shaji RV, Cure for thalassemia major-from allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to gene therapy. Haematologica. 2017;102(2):214-23.
5. Coquerelle S, Ghardallou M, Rais S, Taupin P, Touzot F, Boquet L, Blanche S et al. Innovative Curative Treatment of Beta Thalassemia: Cost-Efficacy Analysis of Gene Therapy Versus Allogenic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. Human Gene Therapy, 2019. 30(6): p. 753-761.
6. May C, Rivella S, Callegari J, Hellers G, Gaensler KML, Sadelain M, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. Nature. 2000;406(6791):82-6.
7. Cavazzana M, Mavilio F. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. Hum Gene Ther, 2018. 29(10):1106-13.
8. Robert LN, Roderick RM, Huntington FW. The Molecular Basis of Genetic Disease General Principles and Lessons from the Hemoglobinopathies Chapter 11. THOMPSON & THOMPSON GENETICS IN MEDICINE 8th EDITION, ELSEVIER; 2015,p. 195-214.
9. Benz EJ. Molecular genetics of the thalassemia syndromes. 2020; Available from: https://www.uptodate.com/contents/molecular-genetics-of-the-thalassemia-syndromes?search=thalassemia%20genetics&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H2.
10. Noordermeer D, Laat W. Joining the loops: β-Globin gene regulation. IUBMB Life. 2008; 60(12):824-33.
11. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(1):a011643.
12. Thein SL. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. Blood Cells Mol Dis. 2018;70:54-65.
13. Tsang JC, Yu Y, Burke S, Buettner F, Wang C, Liu P, et al. Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells. Genome Biol. 2015; 16:178.
14. HbVar. A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. 2020; Available from: http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/ counter.
15. Thein SL. The molecular basis of β-thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013;3(5):a011700.
16. Goodman MA, Malik P. The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges. Therapeutic Advances in Hematology. 2016;7(5):302-15.
17. Lucarelli G, Isgro A, Sodani P, Gaziev J. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(5):a011825.
18. Karponi G, Psatha N, Lederer CW, Adair JE, Zervou F, Yannaki E, et al. Plerixafor+G-CSF-mobilized CD34+ cells represent an optimal graft source for thalassemia gene therapy. Blood. 2015;126(5):616-9.
19. Yannaki E, Karponi G, Zervou F, Constantinou V, Bouinta A, Stamatoyannopoulos G, et al. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with β-thalassemia major. Hum Gene Ther. 2013; 24(10):852-60.
20. Lidonnici MR, Aprile A, Frittoli MC, Mandelli G, Paleari Y, Giuliana F, et al. Plerixafor and G-CSF combination mobilizes hematopoietic stem and progenitors cells with a distinct transcriptional profile and a reduced in vivo homing capacity compared to plerixafor alone. Haematologica. 2017;102(4):e120-e124.

21. Kwiatkowski JL. Gene Therapy for β-Thalassemia, Slideset. 2019; Available from: https://www.clinicaloptions.com/oncology/programs/beta-thalassemia-insights/downloadable-slideset/slideset-2?origin=2.
22. Rivella S. β-thalassemias: paradigmatic diseases for scientific discoveries and development of innovative therapies. Haematologica. 2015;100(4):418-30.
23. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Trono D et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science. 1996;272(5259): 263-7.
24. Mansilla-Soto J, Riviera I, Boulad F, Sadelain M. Cell and Gene Therapy for the Beta-Thalassemias: Advances and Prospects. Human Gene Therapy. 2016;27(4):295-304.
25. Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. Blood. 2003; 101(8):2932-9.
26. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. Nat Rev Cancer. 2003;3(7): 477-88.
27. Hacein-Bey-Abina S, Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, Cavazzana-Calvo M, et al. Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy. New England Journal of Medicine. 2002;346(16):1185-93.
28. Karponi G, Zogas N. Gene Therapy For Beta-Thalassemia: Updated Perspectives. Appl Clin Genet. 2019;12:167-80.
29. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Leboulch P, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β-thalassaemia. Nature. 2010;467(7313):318-22.
30. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Leboulch P, Cavazzana M, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β-Thalassemia. New England Journal of Medicine. 2018;378(16):1479-93.
31. Marktel S, Scaramuzza S, Cicalese MP, Ciceri F, Aiuti A, Ferrari G et al. Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent ß-thalassemia. Nature Medicine. 2019;25(2):234-41.
32. Kulozik AE, Locatelli F, Yannaki E, Porter JB, Thuret I, Thompson AA, et al. RESULTS FROM THE PHASE 3 NORTHSTAR-3 STUDY EVALUATING LENTIGLOBIN GENE THERAPY IN PATIENTS WITH TRANSFUSION-DEPENDENT B-THALASSAEMIA AND A B0 OR IVS-I-110 MUTATION AT BOTH ALLELES OF THE HBB GENE. Presentation during EHA24: On Friday, June 14, 2019 from 11:30-11:45; Available from: https://library. ehaweb.org/eha/2019/24th/267341/andreas.e.kulozik.results.from.the.phase.3.northstar-3.study. evaluating. html?f=listing% 3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Asearch%3Dhgb-212.
33. Locatelli F, Thompson AA, Hongeng S, Porter JB, Sauer MG, Walters MC. SAFETY AND EFFICACY OF LENTIGLOBIN GENE THERAPY IN PATIENTS WITH TRANSFUSION-DEPENDENT B-THALASSAEMIA AND NON-B0/B0 GENOTYPES IN THE PHASE 3 NORTHSTAR-2 STUDY. Presentation during EHA24: On Sunday, June 16, 2019 from 08:00 - 08:15; Available from: https://library. ehaweb.org/eha/2019/24th/267386/franco.locatelli.safety.and.efficacy.of.lentiglobin.gene.therapy.in.patients.html?f=listing%3D3%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Amedia%3D1.
34. Ikawa Y, Miccio A, Magrin E, Kwiatkowski JL, Rivella S, Cavazzana M, et al. Gene therapy of hemoglobinopathies: progress and future challenges. Human Molecular Genetics. 2019; 28(R1):R24-R30.
35. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Trends in Cell Biology. 2016;26(1):52-64.
36. Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romera Z, Kaufman ML, Kohn DB, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. Blood. 2015; 125(17):2597-604.
37. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Arauja AS, Uda M, Orkin SH, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105 (33):11869-74.
38. Vierstra J, Reik A, Chang KH, Stehling-Sun S, Zhou Y, Stamatoyannopoulos JA, et al. Functional footprinting of regulatory DNA. Nat Methods. 2015;12(10):927-30.
39. Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Bauer DE, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. Nature. 2015;527(7577): 192-7.